

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Patología Animal I
(Sanidad Animal)



**APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR (REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA) EN EL DIAGNÓSTICO
Y EPIDEMIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS EN
ANIMALES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Alicia Aranaz Martín

Bajo la dirección de los doctores

Lucas Domínguez Rodríguez
Ana Mateos García
Guillermo Suárez Fernández

Madrid, 2002

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL I

APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR
(REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)
EN EL DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA DE
LA TUBERCULOSIS EN ANIMALES

ALICIA ARANAZ MARTÍN

Memoria presentada para optar al
título de Doctor en Veterinaria

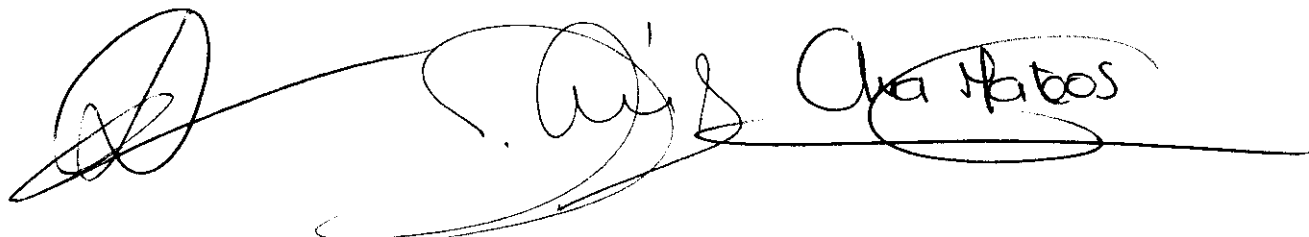
Madrid, 1996

D. LUCAS DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ, D. GUILLERMO SUÁREZ FERNÁNDEZ Y DÑA. ANA MATEOS GARCÍA, CATEDRÁTICOS Y PROFESORA TITULAR DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL I (SANIDAD ANIMAL) DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que esta tesis ha sido realizada por Alicia Aranaz Martín en el Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo nuestra dirección.

Lucas Domínguez Rodríguez Guillermo Suárez Fernández Ana Mateos García

Three handwritten signatures are written over a horizontal line. From left to right, they correspond to Lucas Domínguez Rodríguez, Guillermo Suárez Fernández, and Ana Mateos García. The signatures are fluid and cursive.

Durante la realización de estos trabajos, he tenido la suerte de encontrar en el camino buena gente que ha compartido conmigo mucho tiempo y trabajo, y a la que hoy desearía expresar mi más sincera gratitud,

A mis directores, D. Lucas Domínguez, Dña. Ana Mateos, y D. Guillermo Suarez por su carácter emprendedor, y por la paciencia y el apoyo en la realización de esta tesis. A Lucas, su contagioso entusiasmo y optimismo, su botella (más bien garrafa) totalmente llena, frente a mi botella (más bien sólo vaso) casi vacía. A Ana y a D. Guillermo, el gran interés para que esta tesis saliera adelante y la esmerada revisión del manuscrito.

A Ernesto Liébana, compañero de fatigas, por las miles de horas currando juntos, y las miles de peleas, casi todas ellas fructíferas y por lo menos, animadas.

A mis compañeros, por sus ánimos constantes y su contagiosa alegría, y muy especialmente a Mayte, Mar, Gustavo, Alicia, Louie y Cristina, por su comprensión y amistad día a día.

Al Dr. Enrique Gómez-Mampaso, sin cuya ayuda nunca habríamos empezado este trabajo, por todo lo que afectuosamente nos enseñó y porque tiene toda la razón eso de "la vida es el arte de lo posible".

A Debby Cousins su ayuda y consejos, y a Suzette Williams y Barry Francis (Australian Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis, Agriculture, Western Australia) su colaboración.

A J.C. Tercero (Pharma Gen, S.A.) su apoyo en las fases iniciales de este trabajo.

A M. Domingo y D. Vidal (Histología y Anatomía Patológica, Facultad de Veterinaria de la U.A.B.), J.J. Urquía (Comunidad Autónoma de Madrid), J.M. Cámara (Ayuntamiento de Madrid), C. Novoa, X. Pickering y E. Merlo (Patología Animal II, Facultad de Veterinaria de la U.C.M.), M. Hermoso, J. Hermoso y A. Tato (Patología Infecciosa, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura), M. Hernández (Instituto para la Conservación de la Naturaleza, Madrid), A. Ramis (Patología, Facultad de Veterinaria de la U.A.B.), J.

Fernández (Zoo de Barcelona) y Celia Sánchez (Parque Nacional de Doñana, Huelva), el envío de las muestras.

A O. González y E.F. Rodríguez-Ferri (Patología Animal, Facultad de Veterinaria de León) el préstamo de las cepas de León y la completa información sobre las granjas.

A E. Gómez-Mampaso y J. Blázquez (Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal de Madrid) la cesión de las cepas humanas.

A C. Pascual y D.M. Collins (Institute of Food Research, Reading Laboratory) la secuenciación e identificación del ADN del *M. genavense*.

Al grupo de la Unit Molecular Microbiology y Laboratory of Bacteriology (National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, Holanda) el suministro de las membranas de DVR-spoligotyping.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (Programa de Formación de Personal Investigador), el proyecto AIR PL 920697 de la Unión Europea; el proyecto 92/0251 del Fondo de Investigaciones Sanitarias, el Proyecto I+D 0030/94 de la C.A.M. y por la Australian Bovine Brucellosis and Tuberculosis Eradication Campaign.

A José Carlos

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	3
1.1. La tuberculosis en la antigüedad.....	3
1.2. La tuberculosis en Europa desde la Edad Media al siglo XVIII.....	4
1.3. El descubrimiento de Koch.....	8
1.4. La tuberculina.....	11
1.5. La vacuna BCG.....	12
1.6. La quimioterapia.....	13
2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MICOBACTERIAS.....	15
2.1. Encuadre taxonómico del género <i>Mycobacterium</i>	15
2.2. Clasificación de las micobacterias.....	17
2.3. Características clínicas y tratamiento.....	19
2.4. Detección e identificación de micobacterias.....	23
2.4.1. Microscopía directa.....	24
2.4.2. Cultivo e identificación tradicionales.....	24
2.5. Nuevos métodos de cultivo e identificación.....	29
2.5.1. Sistemas de detección radiométrica.....	29
2.5.2. Cromatografía líquida de alta resolución.....	30
2.5.2. Sondas de ácidos nucleicos.....	30
2.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	31
3. COMPLEJO <i>M. tuberculosis</i>.....	39
3.1. <i>M. tuberculosis</i>	40
3.2. <i>M. bovis</i>	42
3.3. <i>M. africanum</i>	43
3.4. <i>M. bovis</i> BCG.....	43
3.5. <i>M. microti</i>	44
3.6. Micobacteria aislada de los hyrax (<i>Dassie bacillus</i>).....	44
3.7. Micobacteria aislada de las focas (<i>Seal bacillus</i>).....	45
4. COMPLEJO <i>M. avium-intracellulare</i>.....	47
5. PATOGÉNESIS.....	51
5.1. Rutas de infección.....	52

5.1.1. Excreción de <i>M. bovis</i>	54
5.1.2. Supervivencia de <i>M. bovis</i> en el medio.....	55
5.2. La respuesta inmune.....	55
5.2.1. El papel de los fagocitos mononucleares.....	57
5.2.2. Mecanismos microbicidas de los macrófagos.....	58
5.2.3. Citoquinas producidas por los macrófagos.....	63
5.2.4. Reconocimiento del antígeno por los linfocitos T.....	66
5.2.5. Antígenos de las micobacterias reconocidos por los linfocitos T.....	66
5.2.6. Los linfocitos CD4 ⁺	71
5.2.7. Citoquinas producidas por los linfocitos CD4 ⁺	71
5.2.8. Actividad citolítica de las células CD4 ⁺	73
5.2.9. Los linfocitos CD8 ⁺	74
5.2.10. Los linfocitos T $\gamma\delta$	74
5.2.11. Citoquinas: protección e inmunopatología.....	75
5.2.12. El espectro de la respuesta inmune.....	76
5.2.13. La hipersensibilidad de tipo retardado.....	77
5.3. Factores de virulencia: efectos de los constituyentes de las micobacterias en la función de los macrófagos.....	78
5.3.1. Los sulfátidos.....	79
5.3.2. El cord factor.....	79
5.3.3. El lipoarabinomanano.....	80
5.3.4. Las ceras.....	82
5.4. La formación de las lesiones.....	82
6. TUBERCULOSIS, UNA ENFERMEDAD EMERGENTE.....	85
6.1. Epidemiología.....	87
6.2. Asociación entre VIH y tuberculosis.....	89
6.3. Cepas multirresistentes.....	89
6.4. Epidemiología de la infección por <i>M. bovis</i> en los seres humanos.....	90
7. TUBERCULOSIS EN ANIMALES.....	98
7.1. Tuberculosis en el ganado vacuno.....	98
7.1.1. Prevalencia mundial de la tuberculosis en el ganado vacuno.....	98
7.1.2. Patogénesis de las lesiones en el ganado vacuno.....	105
7.1.3. Localización de las lesiones.....	108

7.1.4. Sintomatología.....	108
7.1.5. Infección por otras micobacterias.....	109
7.1.6. Diagnóstico <i>in vivo</i> de la tuberculosis.....	110
7.1.7. Control de la infección.....	122
7.2. Tuberculosis en la cabra y en la oveja.....	125
7.3. Tuberculosis en el cerdo.....	126
7.3.1. Infección por <i>M. tuberculosis</i> y el complejo <i>M. avium-intracellulare</i> ...	127
7.4. Tuberculosis en caballos, asnos y mulas.....	128
7.5. Tuberculosis en perros y gatos.....	128
7.5.1. Epizootiología.....	129
7.5.2. Patogénesis.....	131
7.5.3. Sintomatología.....	132
7.5.4. Hallazgos anatomopatológicos.....	134
7.5.5. Diagnóstico.....	135
7.5.6. Terapia.....	137
7.5.7. Infección por <i>M. avium</i> en perros y gatos.....	137
7.5.8. Infecciones por otras micobacterias	139
7.6. Tuberculosis en camélidos.....	140
7.7. Tuberculosis en ciervos.....	141
7.7.1. Sintomatología y lesiones.....	143
7.7.2. Diagnóstico.....	144
7.7.3. Otras micobacterias.....	146
7.8. Tuberculosis en el jabalí.....	147
7.9. Tuberculosis en tejones.....	148
7.9.1. Diagnóstico.....	149
7.10. Tuberculosis en el conejo y la liebre.....	150
7.11. Tuberculosis en el possum.....	150
7.12. Tuberculosis en mustélidos.....	151
7.13. Tuberculosis en animales exóticos y de zoo.....	152
7.14. Tuberculosis en pinnípedos.....	153
7.15. Tuberculosis aviar.....	154

II. DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE TUBERCULOSIS A PARTIR DE MUESTRAS CLÍNICAS MEDIANTE AMPLIFICACIÓN DEL ADN DE LAS MICOBACTERIAS POR PCR.....159

Resumen.....160

1. INTRODUCCIÓN.....161

2. MATERIAL Y MÉTODOS.....165

2.1. Informe de los animales y recogida de muestras.....165

2.1.1. Ganado vacuno y caprino.....165

2.1.2. Perros y gatos.....165

2.1.3. Animales salvajes.....166

2.1.4. Aves.....166

2.2. Bacteriología.....171

2.2.1. Observación microscópica directa: tinción de fluorescencia.....171

2.2.2. Cultivo.....172

2.2.3. Identificación.....174

2.3. Identificación en muestras clínicas de organismos del complejo *M.*

tuberculosis y *M. avium-intracellulare* por PCR.....177

2.3.1. Desarrollo de una técnica de extracción del ADN a partir
de muestras tisulares.....177

2.3.2. Evaluación del protocolo inicial de extracción del ADN a
partir de las muestras.....179

2.3.3. Amplificación del ADN.....180

2.3.4. Detección de los productos amplificados en gel de agarosa.....186

2.3.5. Southern blotting e hibridación.....186

2.3.6. Incremento de la sensibilidad con el desarrollo de un PCR nested.....189

2.3.7. Incremento de la sensibilidad modificando la técnica de extracción
del ADN de las micobacterias a partir de muestras tisulares.....191

2.3.8. Evaluación del protocolo modificado de extracción del ADN.....195

3. RESULTADOS.....203

3.1. Método elegido para la detección e identificación de tuberculosis en
muestras clínicas mediante PCR.....203

3.2. Diagnóstico por PCR de las muestras de ganado vacuno.....203

3.3. Diagnóstico por PCR de las muestras de perros y gatos.....204

3.4. Diagnóstico por PCR de las muestras de aves.....	209
3.5. PCR nested.....	211
3.6. Modificación del protocolo de extracción.....	212
3.7. Evaluación del nuevo método de extracción.....	213
4. DISCUSIÓN.....	231

III. TIPIFICACIÓN DE CEPAS DEL COMPLEJO *M. tuberculosis* MEDIANTE PCR CON INICIADORES DE SECUENCIA ARBITRARIA.....243

Resumen.....	244
1.INTRODUCCIÓN.....	245
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	247
2.1. Cepas utilizadas en este estudio.....	247
2.2. Preparación del ADN.....	247
2.3. Elección de iniciadores que produzcan un perfil de bandas.....	248
2.3.1. Iniciadores utilizados.....	248
2.3.2. La reacción de PCR.....	249
2.4. Optimización de las condiciones de la reacción.....	250
2.4.1. Optimización de la concentración de ADN diana.....	250
2.4.2. Optimización de la concentración de polimerasa.....	251
2.4.3. Optimización de la concentración de cloruro de magnesio.....	251
2.4.4. Optimización de la temperatura de hibridación.....	251
2.5. Evaluación de los iniciadores y condiciones seleccionadas.....	252
2.6. Reproducibilidad de los resultados.....	252
2.7. Análisis RAPD con los iniciadores OPB-10, OPC-20 e IS-1 en la tipificación de cepas del complejo <i>M. tuberculosis</i>	253
3. RESULTADOS.....	255
3.1. Elección de los iniciadores y reacción de PCR.....	255
3.2. Optimización de la reacción.....	256
3.3. Evaluación de los iniciadores seleccionados.....	257
3.4. Reproducibilidad de los resultados.....	257
3.5. Análisis RAPD de cepas del complejo <i>M. tuberculosis</i>	258
4. DISCUSIÓN.....	281

IV. DVR-SPOLIGOTYPING DE CEPAS DE <i>M. bovis</i>: UNA HERRAMIENTA EN LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS	283
Resumen	284
1. INTRODUCCIÓN	285
2. MATERIAL Y MÉTODOS	289
2.1. Cepas utilizadas en este estudio	289
2.1.1. Cepas de origen animal	289
2.1.2. Cepas de origen humano	297
2.2. Preparación del ADN	297
2.3. Adaptación del método en nuestro laboratorio	298
2.3.1. Evaluación del primer marcado con biotina	298
2.3.2. Concentración del conjugado <i>streptavidin-peroxidase</i> y exposición	300
2.4. Amplificación por PCR de los espaciadores de la región DR	300
2.5. Hibridación de los productos de PCR y detección	301
2.6. DVR-spoligotyping de cepas de otras especies del complejo <i>M. tuberculosis</i>	303
3. RESULTADOS	305
3.1. Estimación de la concentración de ADN	305
3.2. Adaptación del método en nuestro laboratorio	305
3.2.1. Evaluación del primer marcado con biotina	305
3.2.2. Concentración del conjugado <i>streptavidin-peroxidase</i> y exposición	305
3.3. Caracterización mediante DVR-spoligotyping de las cepas de <i>M. bovis</i>	306
3.4. Spoligotipos de cepas de <i>M. bovis</i> aisladas de ganado vacuno	307
3.5. Spoligotipos de cepas de <i>M. bovis</i> aisladas de ganado caprino y ovino	308
3.6. Spoligotipos de cepas de <i>M. bovis</i> aisladas de varias especies animales	309
3.7. Spoligotipos aislados del brote humano de <i>M. bovis</i> multirresistente	309
3.8. Spoligotipos de cepas de varias micobacterias del complejo <i>M. tuberculosis</i>	310
4. DISCUSIÓN	335
CONCLUSIONES	345
BIBLIOGRAFÍA	349

I. INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El origen filogenético del complejo *M. tuberculosis* es incierto y se han propuesto multitud de hipótesis para explicarlo. Según M. D. Grmeck (1983), el género *Mycobacterium* deriva de un antepasado común al que denomina *M. archaicum*. Sus descendientes se dividieron en varias ramas, en una de las cuales se encuentran los parásitos de los vertebrados. Para Grmeck, la asociación inicial de las micobacterias con los animales se produjo antes del paso de los vertebrados de la vida acuática a la vida terrestre, hace más de 300 millones de años.

M. tuberculosis provendría de una forma bovina de *Mycobacterium*, y su aparición dataría del Neolítico, ligada a la domesticación de los bóvidos en este periodo (Morse et ál, 1964). Probablemente tuviese lugar en Africa, actuando como intermediario una forma africana de *Mycobacterium*. Esta hipótesis parece razonable, ya que los microorganismos del complejo *M. tuberculosis* tienen uno de los abanicos de hospedadores más amplios de todas las bacterias patógenas, produciendo enfermedad tanto en animales salvajes como domésticos. La enfermedad causada por otra micobacteria patógena, *M. leprae*, está restringida al hombre, por lo que ésta tendría una aparición posterior, posiblemente a partir del parásito de los roedores, *M. lepraemurium*, de una saprofita o de otra especie desaparecida.

1.1. LA TUBERCULOSIS EN LA ANTIGÜEDAD

La Paleontología ha permitido encontrar las huellas más antiguas de la tuberculosis, remontándose éstas a un posible caso de mal de Pott que data del Neolítico (4.000 a.C.) y a unas momias del antiguo Egipto (aproximadamente 1000 a.C.) que mostraban huellas de tuberculosis ósea (Morse et ál, 1964). En extremo Oriente la tuberculosis ya aparece en varias referencias en los Vedas hindúes, escritos entre el 2.000 y el 1.500 a.C., y en un texto de Medicina (2.700 a.C.), según cita B. Meinecke en 1927. En su literatura médica abundan las referencias a la tos crónica, hemoptisis, adenopatías cervicales, consunción infantil, fiebre ósea, fiebre pulmonar y deformaciones del raquis.

Los griegos usaron la palabra *phthisis*, que significa desgaste o debilitamiento del

cuerpo, similar a consunción, para referirse a los síntomas producidos por la tuberculosis. La primera referencia a la tisis en la Grecia clásica aparece en Herodoto. En los escritos hipocráticos el concepto de tisis se delimita con precisión figurando en el tratado *Sobre las enfermedades*, libro I, entre aquellas afecciones que son invariablemente mortales. Sin embargo, la tisis se confunde con otras afecciones pulmonares crónicas como el empiema y la pleuresía. Los principales síntomas de la tisis, la edad de incidencia, las variaciones estacionales y el pronóstico se discuten con detalle en los tratados que integran la *Colección Hipocrática*. El gran número de descripciones clínicas que se refieren a la enfermedad permiten sospechar que se trataba de una enfermedad frecuente. Dado que en esta época todavía no se realizaban autopsias, el conocimiento de las lesiones tuberculosas parece provenir de la observación de los animales tuberculosos destinados a la alimentación o al sacrificio. En aquellos escritos no se menciona el contagio, aunque conocían que la enfermedad podía producir brotes epidémicos (Báguena, 1992).

En la medicina helenística y romana la tisis continuó siendo una enfermedad común. Plinio el Joven escribió sobre el tratamiento de la tos y de la hemoptisis, y Areteo de Capadocia describe la tuberculosis en *Sobre las causas y los síntomas de las enfermedades crónicas*, volumen I, señalando que el examen del paciente y del esputo tienen mayor valor diagnóstico que el agua o el fuego. Galeno, contemporáneo de Areteo, consideraba que se debía a una ulceración del pulmón que cursaba la mayoría de las veces con hemoptisis, signo patognomónico de esta afección, dolor torácico, tos, expectoración y fiebre. Los textos médicos señalan también la presencia de formas extrapulmonares de tuberculosis. Las escrófulas (palabra derivada de *scrofa*), una forma de tuberculosis no pulmonar especialmente la ganglionar cervical, el tumor blanco de las articulaciones, el lupus tuberculoso y algunas inflamaciones del aparato genito-urinario se consideraban afecciones autónomas. La consunción del ganado vacuno, actualmente conocida como tuberculosis bovina, fue descrita por primera vez por Columella en Italia, en el año 14 a.C. (Wood et ál, 1994).

1.2. LA TUBERCULOSIS EN EUROPA DESDE LA EDAD MEDIA AL SIGLO XVIII

El conocimiento de la tuberculosis apenas cambió hasta el siglo XVII. Los médicos

árabes Razes y Avicena consideraron esta enfermedad una afección generalizada y de carácter contagioso, con manifestaciones locales en forma de úlceras pulmonares. La incidencia de la tuberculosis en la Europa Medieval es difícil de concretar, pero indirectamente puede deducirse que fue elevada debido a la amplia difusión de la "ceremonia del toque real", basada en la creencia del poder sanador de los reyes, que podían curar las escrófulas al tocar a los enfermos (Crawford, 1911).

Los siguientes avances en el estudio de la tuberculosis están asociados a la práctica de autopsias. El clínico holandés Silvio (Franz de le Bøe), en el siglo XVII, fue el primero en aplicar el término tubérculo a las lesiones específicas de la tuberculosis y asoció los granulomas tuberculosos descubiertos en varios tejidos durante la autopsia, a los que denominó *tubercula glandulosa*, con los síntomas de la tisis padecidos por el paciente. En su obra *Opera Medica*, publicada en 1680, diferenció entre tisis y otras enfermedades pulmonares (Grange, 1989). Richard Morton amplió el concepto de tisis en su obra *Phthisiologia* (1720), aplicándolo al debilitamiento del organismo por cualquier causa.

Pierre Dessault, en el siglo XVIII, afirmó que la tisis era contagiosa y que el esputo era el responsable del contagio, punto de vista inaceptable en esa época, como también lo fue la obra de Benjamin Marten *A new theory of consumptions, more specially of a phthisis or consumption of the lungs* (1719), en la que el autor defiende:

"la causa de la enfermedad podían ser probablemente ciertos tipos de animacula o criaturas vivas, maravillosamente diminutas... capaces de subsistir en nuestros jugos y vasos".

Poco después, William Stark fue el primero en examinar con detenimiento el crecimiento y desarrollo de los granulomas tuberculosos, y opinó que la diversidad de cambios estructurales eran el reflejo de las variaciones locales que produce la evolución del proceso patológico, subrayando que la tisis no implicaba enfermedades diferentes a pesar de la diversidad de lesiones pulmonares.

Las medidas profilácticas adoptadas, como la quema de enseres que hubieran

pertenecido a un fallecido por tisis eran ineficaces, y no se conocía ningún tratamiento que eliminara la causa de la enfermedad, desconocida para la época. Según cita Báguena (1992), Bateman, en su obra *Reports on the diseases of London* (1799), estimaba que en la capital británica una de cada cuatro muertes era debida a esta enfermedad. La tuberculosis alcanzó su máxima incidencia entre 1780 y 1880, coincidiendo con el desplazamiento masivo de campesinos a las ciudades en busca de trabajo en las fábricas; afectando especialmente a la clase obrera, debido a sus rudimentarias condiciones de vida en el trabajo y en sus hogares. Las proporciones epidémicas que alcanzó esta enfermedad durante la Revolución Industrial le valieron el sobrenombre de "peste blanca", con un 1% de tasa anual de mortalidad (Caldwell, 1988).

Para el diagnóstico se empezó a utilizar la percusión torácica, descubierta por Leopold Auenbrugger y expuesta en su obra *Inventum novum ex percussione thoracis humani, ut signo abstrusos interni pectoris morbos detegendi*. Redescubierta por Jean Nicolas Corvisart, fue adoptada como método imprescindible en el examen del tórax. René Laënnec inventó en 1818 el estetoscopio, describiendo términos que todavía se utilizan: estertores, soplos, etc..., y las lesiones anatómicas asociadas a los signos descritos. En la segunda edición de su *Traité* describe la clínica, el diagnóstico y el tratamiento de cada enfermedad.

Aunque fue la tuberculosis pulmonar la que acaparó la atención del mundo científico, se encuentran referencias a otras localizaciones de la enfermedad. Robert Whytt describió en 1768 la tuberculosis meníngea, y Robert William una forma de lupus que consideró tuberculosa. Jacques Mathieu Delpech publicó en 1828 que la curvatura del raquis y la parálisis descritas por Percival Pott en 1799 se debían a la presencia de tubérculos. Todo ello llevó a Johann Lukas Schönlein a sugerir en 1839 el término tuberculosis, para englobar todas aquellas manifestaciones de la tisis en las que el tubérculo estuviera presente.

En 1846, Klencke observó que la linfadenitis era más común en niños alimentados con leche de vaca, incriminando a ésta como origen de la enfermedad (Collins et ál, 1983)

En 1849, Hermann Lebert publicó su obra *A practical treatise on escrofulous and*

tuberculous diseases en la que aparecía uno de los primeros estudios microscópicos del tubérculo. Observó una estructura que denominó "corpúsculo tubercular", y que propuso patognomónica para diferenciarla de otras enfermedades asociadas a la formación de pus y caseificación. Sin embargo, Rudolph Virchow consideró la tisis y la tuberculosis dos enfermedades distintas, creyendo asimismo que la tisis era hereditaria.

La causa de la tisis seguía siendo dudosa, pero la creencia de que era hereditaria o constitucional predominaba, permaneciendo abierta la polémica de su contagiosidad (Grange, 1989). Con anterioridad a la implantación de las medidas terapéuticas medicamentosas o higiénicas eficaces, la tuberculosis había empezado a retroceder unos treinta años antes que otras enfermedades infecciosas graves (McKeown, 1965); la causa de este descenso podría ser consecuencia de un mayor calidad de vida respecto a las condiciones de alojamiento, alimentación y salubridad (Collins, 1984).

La tuberculosis fue descrita por primera vez en perros y gatos a principios del siglo XIX, pero no se relacionó con la enfermedad humana hasta 1839 y 1883 respectivamente (Snider, 1971).

La identificación del agente causal de la tuberculosis estuvo precedida por la comprobación del carácter infeccioso de esta afección. En 1865, Jean Antoine Villemin realizó experimentos sobre la transmisión de la tuberculosis. Encontró granulomas tuberculosos en el peritoneo, pulmones, etc... de conejos inoculados con material tuberculoso. Cuando utilizó material tuberculoso extraído de una vaca, los conejos inoculados enfermaron con gran rapidez, presentando en el examen *post mortem* una tuberculosis aguda generalizada. No obstante, mantuvo que la tuberculosis era la misma, tanto si el hospedador era un animal como si era una persona. Declaró que era una infección específica, que su agente etiológico era inoculable y se multiplicaba y propagaba en el organismo hospedador, que la inoculación del hombre al conejo podía realizarse con rapidez y que la enfermedad debería incluirse por lo tanto en el grupo de enfermedades virulentas. Posteriormente publicó un libro, *Études sur la tuberculose: preuves rationnelles et expérimentales de sa spécificité et de son inoculabilité*, en el que aporta nuevas pruebas experimentales de su transmisión, no sólo del hombre a los

animales, sino también entre animales de la misma y diferente especie. El contagio se producía tanto con material extraído del tubérculo como con secreción bronquial. En 1877, H. E. von Tapeinner reprodujo la tuberculosis en perros mediante inoculación de esputos contaminados.

1.3. EL DESCUBRIMIENTO DE KOCH

Robert Koch comenzó su investigación sobre el agente causal de la tuberculosis en 1881. Desarrolló técnicas de tinción en tejidos y de inoculación en animales, e interesado en la técnica de cultivos puros, estudió también los medios sólidos y semisólidos. Koch observó sobre la superficie de una lámina de patata el crecimiento de pequeñas masas de bacterias, que denominó colonias, formadas por millones de un solo tipo de bacteria. Preparó medios de cultivo sólido añadiendo gelatina, y posteriormente agar, al caldo de cultivo (Alcamo, 1994). Para demostrar la presencia del microorganismo responsable de la tuberculosis, Koch recogió muestras de lesiones tuberculosas recientes y tiñó este material con azul de metileno de Erlich. Encontró unos bastoncillos tenues que no se veían en el material de control. Según cita Báguena (1992), Koch relacionó las peculiares características de tinción del bacilo con sus propiedades poco habituales, indicando en su primera obra sobre el tema:

"parece como si el bacilo tuberculoso estuviera rodeado de una pared especial de propiedades inusuales y que la penetración de un colorante a través de ella sólo sucediera en presencia de un álcali, de anilina o de una sustancia similar".

Tras múltiples intentos, Koch preparó un medio con suero sanguíneo coagulado que aportaba los nutrientes necesarios y que constituía además un medio de cultivo sólido. Extrajo tejido tuberculoso de animales de experimentación y lo inoculó asépticamente en el medio. Al cabo de 2 semanas de incubación a 37°C, aparecieron unas pequeñas y tenues colonias. Para demostrar que los cultivos puros obtenidos a partir de la materia tuberculosa producían la enfermedad utilizó cobayas, que rápidamente murieron de tuberculosis con los mismos síntomas y lesiones que aparecían en los inoculados con material tuberculoso humano. De las lesiones de estos animales pudo aislar nuevamente el bacilo patógeno. Koch presentó su trabajo en 1882 en el *Berliner Klinische Wochenschrift* en el artículo "*Die aetologie der*

tuberculose". Muy pronto, la presencia del bacilo tuberculoso en el esputo fue considerada como una prueba diagnóstica clave de la enfermedad. Koch llamó al bacilo simplemente *Tuberkelbacillen* (*Tuberkelbacillus*), y W. Zopf en 1883 propuso el nombre *Bacterium* o *Bacillus tuberculosis* (Collins et ál, 1983). K. Lehmann y R. Neumann en 1896, introdujeron el nombre de género *Mycobacterium*, refiriéndose a la capacidad del bacilo para formar una película, semejante a la de los hongos, al crecer en medio líquido. *Mycobacterium leprae*, descubierto en 1873 por Armauer Hansen, fue también incluido en este género, ya que resistía la decoloración con ácidos; por esta razón se les denominó bacilos ácidoalcohol resistentes.

La visualización del bacilo se perfeccionó casi simultáneamente; Paul Ehrlich mejoró el método de tinción utilizando anilina en vez de amoníaco y fucsina en lugar de azul de metileno. Franz Ziehl y Friedrich Neelsen introdujeron la fucsina y el ácido fénico. Este método de tinción, que continúa utilizándose actualmente, se desarrolló el año siguiente del descubrimiento de Koch.

Koch continuó trabajando sobre el cultivo e infección experimental del bacilo tuberculoso por diferentes vías, provocando la enfermedad en 10 especies animales diferentes. En 1884 publicó un nuevo artículo sobre el agente etiológico de la tuberculosis en la revista *Mittheilungen aus der Kaiserlichen Gesundheitsamt* en el que anunció los famosos "postulados de Koch".

En 1896, Wilhelm Conrad Röntgen anunció el descubrimiento de los rayos X. Empezaron a utilizarse en el diagnóstico de los casos de tuberculosis dudosos, relacionándose los signos radiográficos con los encontrados en la exploración física. Poco a poco, su uso se extendió a todos los dispensarios antituberculosos y sanatorios.

Theobald Smith descubrió en 1898 que los agentes productores de la tuberculosis humana y bovina diferían en pequeñas pero constantes características, en particular, que las cepas bovinas eran más cortas, crecían *in vitro* más lentamente y en menor cantidad, y eran más virulentas para un grupo de animales de experimentación, especialmente para el conejo. Tras estas observaciones, introdujo los términos de bacilo de la tuberculosis humano y bovino.

R. Koch afirmó en el *British Congress on Tuberculosis*, celebrado en Londres en 1901, que los seres humanos eran inmunes contra la infección originada por el bacilo de la tuberculosis bovina, o tan escasamente susceptibles, que el agente de la tuberculosis bovina no constituía una amenaza para la población humana, y que por lo tanto no era necesario intentar controlar la enfermedad en el ganado ni tomar medidas para contrarrestar el riesgo de infección. Además, la tuberculosis humana difería de la bovina, y no podía ser transmitida al ganado (Collins et ál, 1983; Grange et ál, 1994).

Esta errónea conclusión animó a Koch y a von Berhring a preparar vacunas para uso veterinario a partir del bacilo humano, supuestamente atenuado por envejecimiento en cultivo, denominadas *Tauruman* y *Bovo*, respectivamente. Comenzaron a utilizarse hasta que Griffith demostró que el ganado vacunado eliminaba bacilos viables y virulentos en la leche (Griffith, 1913).

La segunda consecuencia a las declaraciones de Koch fue la oleada de protestas levantada por los veterinarios. El Ministerio de Agricultura británico estableció una comisión de trabajo experimental para adquirir los conocimientos necesarios sobre dicho tema. La comisión decidió patrocinar un programa de investigación incluyendo una granja experimental y un laboratorio. Desde 1901 a 1911 demostró la existencia de tres tipos diferentes de bacilos (humano, bovino y aviar), además de micobacterias de naturaleza saprofita, y reunió evidencias contundentes de la amenaza que suponía la tuberculosis del ganado para la salud humana, del riesgo de infección pulmonar adquirido por inhalación, y estableció que la leche era el principal vector de transmisión. Durante todo el siglo pasado se sospechaba que la leche era la fuente de la tuberculosis infantil, y el descubrimiento del bacilo condujo a la introducción de su pasteurización obligatoria, reduciendo así la incidencia de la tuberculosis abdominal, aunque no la del cuadro pulmonar. Esta comisión estudió también la utilización de la tuberculina en los animales.

La conclusión final alcanzada por la comisión en 1911 fue que "*las vacas tuberculosas suponen un riesgo para la Salud Pública, ya que el hombre debe ser incluido en la lista de los animales susceptibles al bacilo de la tuberculosis bovina*" (Collins et ál, 1983). Sin

embargo, hasta 1935 no se introdujo en el Reino Unido el proyecto de ganado certificado (*Attested Herd Scheme*); momento en el que un 40% de todo el ganado sacrificado en los mataderos presentaba lesiones de tuberculosis y el 0,5% de las vacas lecheras eliminaban bacilos en la leche (Savage, 1933). El objetivo de este plan era someter a la prueba de la tuberculina a todo el ganado vacuno, sacrificar a los que reaccionasen positivamente y compensar económicamente a los propietarios.

Conocido el agente y la forma de transmisión de la tuberculosis comenzó la lucha contra el bacilo, centrada en la búsqueda de un remedio curativo y una vacuna eficaz, además de establecer medidas sanitarias, apareciendo los primeros sanatorios y dispensarios antituberculosos.

1.4. LA TUBERCULINA

Koch observó que la inoculación de bacilos viables, o el medio en que el bacilo había crecido, producía en la piel de cobayas sensibilizados una reacción necrótica que aparentemente destruía el bacilo. Esta sustancia (tuberculina vieja, OT) se ensayó inmediatamente en el hombre. La mayor parte de los enfermos tuberculosos mostraron una fuerte reacción a la inoculación del preparado, que se denominó "fenómeno de Koch", y que más adelante iba a tener un importante valor diagnóstico. Estas reacciones de hipersensibilidad se interpretaron inicialmente como curaciones, pero un resumen de todos los casos tratados mostró que no podía considerarse remedio curativo. Koch dió a conocer la composición y modo de preparación de su remedio en 1891.

La tuberculina había quedado descartada como sustancia terapéutica, pero su valor diagnóstico era evidente; la prueba de la tuberculina sigue vigente en la medicina preventiva actual. Su mecanismo de acción no comenzó a ser explicado hasta que Clemens von Pirquet describió en 1906 la "alergia" como fenómeno de sensibilización. En 1908, como consecuencia de la búsqueda de una forma de inoculación que no produjera una fuerte reacción general, se introdujo la intradermorreacción de Mantoux, en la que una cantidad de tuberculina medida con precisión se inyecta a una profundidad conocida, permitiendo una

mayor certeza en el diagnóstico, así como una comparación de los resultados obtenidos en pruebas sucesivas. Con el objetivo de disminuir las reacciones no específicas asociadas a la anterior, la tuberculina antigua fue poco a poco sustituida por un derivado proteico purificado (PPD).

Los primeros esfuerzos para la detección del ganado tuberculoso estuvieron basados en la auscultación, la percusión y la palpación de la ubre y de los ganglios linfáticos superficiales. La prueba de la tuberculina se aplicó en veterinaria cuando se descubrió que los animales infectados presentaban una respuesta febril a la inoculación subcutánea de 0,2-0,5 ml de tuberculina, considerada de valor diagnóstico. En 1891, un comité de la Universidad de Pensilvania obtuvo las siguientes conclusiones: (1) la inyección subcutánea de tuberculina produce una reacción febril en las vacas tuberculosas, (2) las vacas sanas no reaccionan frente a dosis moderadas de tuberculina, (3) algunos animales tuberculosos no reaccionan con las dosis habituales, (4) no existe efecto curativo demostrado, (5) las vacas dejan de reaccionar tras dosis repetidas del producto, y (6) la tuberculina es útil para el diagnóstico de la tuberculosis en el ganado (Miller, 1989). Los primeros informes de su sensibilidad sugieren que detectaba el 90-95% del ganado tuberculoso (McFadyean, 1899). Posteriormente, en 1908, M. Moussu y C. Mantoux describieron la prueba intradérmica en el ganado vacuno. Su utilización en los programas de saneamiento ha contribuido a la erradicación de esta enfermedad en muchas partes del mundo (Monaghan et ál, 1994).

1.5. LA VACUNA BCG

Entre 1908 y 1921, Albert Calmette y Camille Guérin subcultivaron 230 veces en caldo de patata glicerinado que contenía bilis de buey una cepa virulenta de *M. bovis* aislada por Nocard de leche de vaca. Observaron que presentaba una menor virulencia que la cultivada sin bilis y que los cultivos sucesivos ocasionaban una pérdida progresiva de ésta. Esta cepa, que recibió el nombre de Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), ha sido desde entonces masivamente utilizada para la vacunación de tuberculosis en todo el mundo. El Comité de Higiene de la Sociedad de las Naciones dictaminó que ésta vacuna era inocua y que producía cierto grado de inmunidad. Posteriores investigaciones renovaron el interés por

este método de inmunización. Además, el gran aumento experimentado por la tuberculosis tras la II Guerra Mundial, obligó a la utilización masiva de la BCG en toda Europa. En 1949, la Organización de las Naciones Unidas a través de la UNICEF se unió a esta Campaña para organizar vacunaciones en los países del tercer mundo. Se calcula que se han administrado 3 mil millones de dosis de BCG (Bloom, 1989).

1.6. LA QUIMIOTERAPIA

Más de 60 años separan el descubrimiento del bacilo y el hallazgo de agentes antituberculosos apropiados para uso clínico. Numerosos científicos investigaron las posibilidades terapéuticas de gran cantidad de sustancias en busca de un remedio contra la tuberculosis, desde la cal a las sales de oro (aurotiosulfato sódico). El primer antibiótico eficaz frente al *M. tuberculosis* fue la estreptomina, descubierta en 1943 por Selman Abraham Waksman y sus colegas, a partir de *Streptomyces griseus*. El principal problema en su utilización fue la aparición de cepas resistentes a su acción. Jörgen Lehmann descubrió el ácido paraaminosalicílico (PAS) y pronto se comprobó que la utilización conjunta de la estreptomina y del PAS retrasaba o impedía la aparición de resistencias.

En 1951 se demostró la utilidad de la isoniazida, pero pronto aparecieron cepas resistentes, por lo que el tratamiento se reorientó a una administración conjunta con estreptomina y PAS. Esta quimioterapia combinada, de larga duración, podía conseguir la curación completa de la tuberculosis tanto pulmonar como extrapulmonar cuando se comenzaba en una fase temprana, evitando las resistencias. En 1958 se comprobó su valor como quimioproláctico. Entre 1947 y 1960, el uso de los tuberculostáticos se hizo general, produciéndose una marcada disminución en la tasa de mortalidad por tuberculosis, así como en el número de casos. En los años siguientes se descubrieron la pirazinamida, etionamida, tiomicina, cicloserina y capreomicina, etambutol y rifampicinas. La Organización Mundial de la Salud aconseja el uso combinado de isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol diariamente durante dos meses, continuado por isoniazida y rifampicina, tres veces a la semana durante 4 meses (WHO, 1995).

El uso conjunto de la quimioterapia y la aplicación de medidas sanitarias (vacunación masiva con BCG, intradermotuberculinización e ingreso en sanatorios) inició una época dorada en el control de esta enfermedad, permitiendo disminuir su incidencia hasta niveles prácticamente cero en los países más desarrollados, y predecir su erradicación del mundo occidental en el año 2.000. Sin embargo, esta reducción se ha visto truncada en la última década por un alarmante aumento en el número de casos, agravado por la epidemia del virus de la inmunodeficiencia humana, y por la aparición de cepas multirresistentes (Collins, 1994).

2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MICOBACTERIAS

2.1. ENCUADRE TAXONÓMICO DEL GÉNERO *Mycobacterium*

En la última edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, el género *Mycobacterium* ocupa la sección 16. Las micobacterias aparecen descritas como bacilos de crecimiento lento, aeróbios, inmóviles y característicamente ácidoalcohol resistentes. Aunque la familia *Mycobacteriaceae* está tratada separadamente, los microorganismos que la integran están estrechamente relacionados con los pertenecientes a los géneros *Corynebacterium*, *Rhodococcus* y *Nocardia*; diferenciándose principalmente en el tipo de pared celular. En la tabla I.1 pueden observarse las principales características de estos géneros.

Tabla I.1. Diferenciación del género *Mycobacterium* de otros géneros relacionados (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, 1986).

Característica	<i>Mycobacterium</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>
Morfología	Bacilos, ocasionalmente filamentos ramificados, sin micelio aéreo ^a	Micelial, fragmenta en cocos y bacilos, micelio aéreo	Escaso micelio, fragmenta en cocos y bacilos, sin micelio aéreo.	Bacilos pleomórficos, en empalizada.
Crecimiento, colonias visibles	2-40 días	1-5 días	1-3 días	1-2 días
% moles de G+C	62-70	60-69	59-69	51-59
Nº de carbonos en ácidos micólicos	60-90	46-60	34-64	22-32
Ácidoalcohol resistencia	+ ^b	-	-	-
Grado de ácido resistencia	Fuerte	Parcial	Parcial	Débil
Grado de tinción de Gram	Débil	Fuerte	Fuerte	Fuerte
Penicilina	Resistente ^c	Resistente	Sensible	Sensible
Sensibilidad a la lisis con lisozima	Resistente	Variable	Sensible	Sensible

^a Algunas especies pueden producir micelio aéreo ocasionalmente.

^b En algunas especies esta resistencia se pierde en una proporción de células, parcial o completamente, en algunos momentos del crecimiento.

^c Algunas especies, por ejemplo *M. avium*, pueden ser sensibles.

La descripción de las micobacterias como ácido-alcohol resistentes implica que tras

la tinción resisten la decoloración con alcohol acidificado, así como con ácidos minerales fuertes. Otras bacterias pertenecientes a los géneros *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Gordona*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella* pueden resistir parcialmente la decoloración con ácidos débiles, especialmente cuando han crecido en medios ricos en lípidos, pero son fácilmente decoloradas con alcohol. El grado de ácido-alcohol resistencia varía con la técnica y las condiciones de cultivo (Harrington, 1966), pero todas las micobacterias son ácido-alcohol resistentes al menos en algún estadio de su crecimiento. Esta propiedad se debe al elevado contenido en lípidos en su pared celular; entre los que se incluyen los característicos ácidos micólicos, solubles en cloroformo, de 60 a 90 átomos de carbono en cadenas ramificadas y con un punto de fusión muy alto (Goodfellow et ál, 1982). Los ácidos micólicos están unidos al peptidoglicano mediante el arabinogalactano. Por pirólisis, estos ácidos se degradan en característicos ésteres metílicos de ácidos grasos de 22 a 26 átomos de carbono (Lévy-Frébault et ál, 1992). La mayoría de las especies de micobacterias sintetizan ácidos micólicos con grupos metoxi, ceto, epoxi y carboxílico (Lévy-Frébault et ál, 1992). De menor longitud, están también presentes en los géneros *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Gordona*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella* (Wayne et ál, 1986), y, por pirólisis producen cadenas de 12 a 22 átomos de carbono (Goodfellow et ál, 1984).

Los componentes de la pared celular de las micobacterias están implicados en la respuesta del hospedador en la tuberculosis y otras micobacteriosis (Goren et ál, 1979). La pared celular es de tipo IV, ya que su peptidoglicano (un polímero altamente entrecruzado de aminoácidos y aminoazúcares) contiene ácido mesodiaminopimélico, alanina, ácido glutámico, glucosamina, ácido murámico, arabinosa y galactosa (Lechevalier et ál, 1970). Esta pared celular tiene una estructura tripartita (Imaeda et ál, 1968), formada por tres láminas, denominadas L1, L2 y L3 (Barksdale et ál, 1977). La L3 corresponde a la verdadera pared celular, y las dos capas exteriores corresponden con estructuras unidas no covalentemente a la anterior (Draper, 1982). Esta envoltura posee una lámina electróndensa de peptidoglicano, rodeada de una lámina electrotransparente de arabinogalactano y ácidos micólicos (Draper, 1982), formando el complejo micólico-arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP complex).

El género *Mycobacterium* (Lehmann et ál, 1896) incluye bacilos rectos o ligeramente

curvos, cuyo tamaño oscila entre 0,2 y 0,6 por 1,0 y 10 micrómetros; algunas veces forman ramificaciones, filamentos, o un crecimiento semejante a micelios fácilmente fragmentables en elementos bacilares y cocoides. No forman hifas aéreas visibles macroscópicamente. Son Gram positivos, aunque no se tiñen perfectamente por este método. Son aeróbios, inmóviles y no forman endosporas. El contenido de G+C del ADN, establecido por determinación de su T_m (temperatura a la cual el 50% de ADN de doble cadena está desnaturalizado) (Mandel et ál, 1968) y por cromatografía líquida de alta resolución (Crowther et ál, 1986), varía entre el 61 y 71% (Wayne et ál, 1968; Lévy-Frébault et ál, 1992). El contenido de G+C de *Mycobacterium leprae* es menor, de 54 a 57% (Clark-Curtiss et ál, 1985). Además de la especie tipo, *Mycobacterium tuberculosis*, este género posee más de 50 especies, algunas de ellas agentes etiológicos de enfermedades para el hombre y los animales.

2.2. CLASIFICACION DE LAS MICOBACTERIAS

En 1959, E. H. Runyon clasificó estos microorganismos en cuatro grupos basándose en las características de velocidad de crecimiento, pigmentación y morfología de las colonias. Se considera que una micobacteria es de crecimiento lento cuando una dilución 10^{-4} de una suspensión del cultivo con aproximadamente 1 mg de bacilos/ml requiere más de siete días para producir colonias visibles en un medio sólido. Estas especies no crecen además en medios bacteriológicos estandar, en los que si se desarrollan las de crecimiento rápido (Lévy-Frébault et ál, 1992).

Una de las características de algunas micobacterias es la producción, regular o variable, de pigmentos carotenoides, amarillos, naranjas o más raramente rosas. En algunas especies, la síntesis de estos pigmentos está específicamente inducida por la exposición de las colonias jóvenes a la luz. La pigmentación se determina inoculando dos tubos de medios de cultivo e incubando uno de ellos en la oscuridad. Una vez observado crecimiento en el tubo control, el tubo mantenido en la oscuridad es expuesto a la luz una o dos horas, y reincubado 24 horas más para comprobar la existencia de pigmentación (Wayne et ál, 1974). De acuerdo a estas características, la clasificación de Runyon es la siguiente:

I. Especies fotocromógenas: incluye los microorganismos de crecimiento lento

(requieren más de 7 días de incubación en condiciones óptimas para formar colonias fácilmente visibles) que producen pigmento solamente si son expuestas a la luz.

II. Especies escotocromógenas: especies de crecimiento lento productoras de pigmentos amarillo-naranja al ser incubados tanto en presencia de luz como en la oscuridad.

III. Especies no cromógenas de crecimiento lento.

IV. Especies de crecimiento rápidos, de pigmentación variable.

Wayne y Kubica indican en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1986) que las micobacterias de crecimiento lento y rápido están muy relacionadas en términos de homología de ADN (Baess et ál, 1978; Mordarski et ál, 1980). Todas las micobacterias de crecimiento lento poseen una copia de los genes que codifican para el ARN, mientras que las crecedoras rápidas tienen al menos dos (Bercovier et ál, 1986). El análisis de la secuenciación del ARNr 16S separa claramente los componentes de ambos grupos (Stackebrandt et ál, 1988; Stahl et ál, 1990). Esta clasificación se corresponde también con la composición antigénica (Stanford et ál, 1974; Chaparas et ál, 1978), la composición lipídica (Minnikin et ál, 1980) y la susceptibilidad a bacteriófagos (Froman et ál, 1954).

Actualmente esta clasificación ha sido casi completamente sustituida por otra basada en las características patogénicas y del cuadro clínico que producen, así como en las relaciones genéticas entre las micobacterias, agrupando a estos microorganismos en grupos y complejos:

- * Grupo de las micobacterias no cultivables o muy difícilmente cultivables, productoras de lesiones dérmicas y nerviosas: *M. leprae* y *M. lepraemurium*.
- * Complejo *M. tuberculosis*: formado por los productores de la tuberculosis humana y animal: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*.
- * Grupo MOTT (*mycobacteria other than tuberculosis*): en la literatura aparecen frecuentemente denominadas como atípicas, anónimas o inclasificadas. Comprenden una amplia variedad de microorganismos, algunos de ellos subagrupados en complejos, e incluye patógenos, saprofitos y patógenos oportunistas. Dentro de este grupo destaca el complejo *M. avium-intracellulare-scrofulaceum*, responsable de infecciones

diseminadas en personas y animales.

2.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y TRATAMIENTO

El género *Mycobacterium* incluye bacterias que son parásitos obligados, cuyos nichos ecológicos más importantes son los animales infectados, especies saprofitas de vida libre en el suelo y en el agua, y formas intermedias. Con inóculos suficientemente grandes todas las micobacterias producen lesiones granulomatosas en animales de experimentación; sin embargo, sólo algunas de éstas son capaces de multiplicarse en los tejidos del hospedador de forma autolimitante o progresiva. Dependiendo de las especies involucradas, éstas muestran predilección por órganos internos, la piel, los nervios o el tracto digestivo.

Las micobacterias atípicas son ubicuas en la naturaleza y su potencial patógeno para personas y animales varía, pudiendo colonizar un determinado órgano de un individuo sin producir síntomas, por lo que su solo aislamiento no implica enfermedad, y generalmente necesitan una condición predisponente (daño pulmonar preexistente, tumores, heridas o inmunosupresión) para multiplicarse en los tejidos (Woods et ál, 1987). Los postulados para aceptar el papel patógeno de una micobacteria atípica incluyen una evidencia de afección clínica que pueda ser debida a esa micobacteria, ausencia de aislamiento de *M. tuberculosis*, *M. bovis* u otra micobacteria patógena que pudiera ser responsable, aislamiento abundante de la micobacteria atípica (100 colonias) y comprobación de las lesiones histológicas específicas en los órganos afectados. En las tablas I.2 y I.3 se mencionan las micobacterias de crecimiento lento y rápido, respectivamente, y las enfermedades que pueden producir.

Tabla I.2. Especies de crecimiento lento del género *Mycobacterium* y enfermedades que causan más frecuentemente (Wayne et ál, 1986; Woods et ál, 1987; Wayne et ál, 1992; Quinn et ál, 1994).

Especie	Enfermedad natural
<i>M. tuberculosis</i>	Tuberculosis en el hombre, primates, carnívoros, cobaya, etc...
<i>M. bovis</i>	Tuberculosis en rumiantes, suidos, carnívoros, hombre, conejo, etc...
<i>M. microti</i>	Tuberculosis en campañoles
<i>M. africanum</i>	Tuberculosis humana en África tropical

(Continuación)

<i>M. kansasii</i>	Enfermedad pulmonar crónica en el hombre Aislado de lesiones tuberculosas de pulmón y ganglios linfáticos de ciervos, cerdos y vacas
<i>M. marinum</i>	Úlceras y granulomas cutáneos en el hombre Granulomas y enfermedad diseminada en peces, anfibios y mamíferos acuáticos
<i>M. gastri</i>	Considerado no patógeno
<i>M. nonchromogenicum</i>	Considerado no patógeno
<i>M. terrae</i>	Considerado no patógeno
<i>M. triviale</i>	Considerado no patógeno
<i>M. malmoense</i>	Ocasionalmente enfermedad pulmonar crónica en el hombre
<i>M. shimoidei</i>	Enfermedad pulmonar en el hombre
<i>M. gordonae</i>	Considerado no patógeno
<i>M. asiaticum</i>	Aislado de monos Ocasional enfermedad pulmonar en personas
<i>M. szulgai</i>	Enfermedad pulmonar crónica, adenitis y bursitis en el hombre
<i>M. simiae</i>	Enfermedad pulmonar crónica, osteomielitis y enfermedad diseminada humana
<i>M. scrofulaceum</i>	Linfadenitis cervical en niños Lesiones tuberculosas de ganglios linfáticos de cerdos, búfalos y vacas
<i>M. avium-M. intracellulare</i>	Linfadenitis cervical en niños, enfermedad pulmonar y diseminada en personas inmunodeprimidas Tuberculosis aviar, lesiones en ganglios cervicales y del tracto digestivo en cerdos, raramente lesiones intestinales y diseminadas en mamíferos, incluyendo primates Tuberculosis pulmonar, hepática y renal en tortugas marinas
<i>M. paratuberculosis</i>	Enfermedad de Johne en bóvidos y otros rumiantes Enfermedad de Crohn en el hombre
<i>M. xenopi</i>	Ocasional enfermedad pulmonar crónica humana Úlceras cutáneas en gatos y sapos, lesiones en los ganglios linfáticos del digestivo en cerdos
<i>M. ulcerans</i>	Úlceras cutáneas y granulomas subcutáneos en humanos
<i>M. haemophilum</i>	Úlceras cutáneas y granuloma subcutáneo en personas inmunodeprimidas
<i>M. farcinogenes</i>	Enfermedad linfática del ganado vacuno en África
<i>M. lepraemurium</i>	Lepra murina y enfermedad nodular cutánea de los gatos
<i>M. leprae</i>	Lepra humana

Tabla I.3. Especies de crecimiento rápido del género *Mycobacterium* y enfermedades que causan más frecuentemente (Wayne et ál, 1986; Woods et ál, 1987; Wayne et ál, 1992; Quinn et ál, 1994).

Especie	Enfermedad natural
<i>M. chelonae</i>	Ocasionalmente infecciones cutáneas, pulmonar, diseminadas y postoperatorias en personas Lesiones pulmonares en tortugas, granulomas diseminados en peces Lesiones granulomatosas en ganglios linfáticos de vacuno, abscesos y lesiones nóduloulcerativas en gatos, cerdos y manatíes Abscesos en ganglios linfáticos y enfermedad diseminada en monos
<i>M. fortuitum</i>	Ocasionalmente infecciones cutáneas, pulmonar, diseminadas y postoperatorias en humanos Granulomas diseminados en ranas Granulomas en ganglios linfáticos y ubres del vacuno, granulomas en ganglios linfáticos, pulmón y articulaciones en cerdos, lesiones granulomatosas en el pulmón y la piel en perros, lesiones ulcerativas y piogranulomatosas en la piel de los gatos
<i>M. chitae</i>	Considerado no patógeno
<i>M. senegalense</i>	Enfermedad linfática del ganado vacuno en África
<i>M. agri</i>	No considerado patógeno
<i>M. smegmatis</i>	Ocasionalmente lesiones cutáneas en gatos, mastitis granulomatosas en vacas
<i>M. phlei</i>	No considerado patógeno, ocasionalmente lesiones cutáneas en gatos
<i>M. thermoresistibile</i>	No considerado patógeno Ocasional enfermedad pulmonar en humanos
<i>M. aichiense</i>	No considerado patógeno
<i>M. aurum</i>	No considerado patógeno
<i>M. chubuense</i>	No considerado patógeno
<i>M. duvalii</i>	No considerado patógeno
<i>M. flavescens</i>	No considerado patógeno
<i>M. gadium</i>	No considerado patógeno
<i>M. gilvum</i>	No considerado patógeno
<i>M. komossense</i>	No considerado patógeno
<i>M. neoaurum</i>	No considerado patógeno
<i>M. obuense</i>	No considerado patógeno
<i>M. parafortuitum</i>	No considerado patógeno
<i>M. rhodesiae</i>	No conocida
<i>M. sphagni</i>	No considerado patógeno
<i>M. tokaiense</i>	No considerado patógeno
<i>M. vaccae</i>	Aislado de ubre y lesiones cutáneas del ganado vacuno

(Continuación)

<i>M. porcinum</i>	Linfadenitis en cerdo
<i>M. fallax</i>	No conocida
<i>M. austroafricanum</i>	No conocida
<i>M. diernhoferi</i>	No considerado patógeno
<i>M. pulveris</i>	No considerado patógeno

El tratamiento depende de cada microorganismo, pero en general son terapias muy largas y los antibióticos encuentran dificultades en alcanzar su objetivo, ya que estas bacterias suelen ser parásitos intracelulares y las lesiones están encapsuladas. Las micobacterias son relativamente resistentes a la mayoría de antibióticos de amplio espectro, con la excepción de la estreptomicina y la rifampicina. El tratamiento de la tuberculosis humana implica la utilización de una combinación de diferentes antibióticos, dependiendo de si el paciente ha estado solamente expuesto o ha desarrollado la enfermedad, y de la aparición de resistencias; los mismos principios generales deberían ser aplicados al considerar el tratamiento de los animales en los que no esté legalmente prohibido.

Tabla I.4. Regímenes terapéuticos en tuberculosis (Greene, 1984).

Terapia	Fármaco
Quimioprofilaxis	Isoniazida
Primera línea (combinación)	Isoniazida Rifampicina Estreptomicina Etambutol
Segunda línea (resistencias)	Ácido Paraaminosalicílico Pirazinamida Etionamida Cicloserina Kanamicina

La quimioprofilaxis con isoniazida durante 6 meses a 1 año es aconsejable en caso de exposición a la infección, y cuando una inmunosupresión aumenta la posibilidad de desarrollar la enfermedad activa. En los tratamientos combinados iniciados en los años 50 se comprobó que el uso conjunto de isoniazida con estreptomicina y ácido paraaminosalicílico, obtenía una

tasa de curación superior al 90%, sin embargo requería un tratamiento de 24 meses. En los 60, se observó que los pacientes que recibían quimioterapia no constituían un riesgo de contagio, el etambutol reemplazó al ácido paraaminosalicílico y la duración del tratamiento se redujo a 18 meses.

En los 70 se utilizó la terapia de 9 meses, combinando rifampicina con isoniazida más estreptomicina y etambutol los dos primeros meses. Posteriormente, se comprobó que la adición de pirazinamida a la combinación de isoniazida y rifampicina administrada durante un periodo de 6 meses (quimioterapia de curso corto o SCC) tiene una tasa de curación superior al 90% (Cohn et ál, 1990). Estos fármacos son sustituidos por otros más tóxicos si aparecen o se sospecha de resistencias. La tasa de curación es alta incluso en circunstancias sociales, políticas y económicas difíciles: 96% en Malawi y 86% en Tanzania.

La mayor parte de los quimioterápicos utilizados para tratar las infecciones por *M. tuberculosis* y *M. bovis* (isoniazida, etambutol, pirazinamida, ácido paraaminosalicílico) son bastante específicos para estos microorganismos y muestran escasa acción inhibitoria frente a otras especies de micobacterias. Algunas infecciones no responden al tratamiento y deben ser eliminadas quirúrgicamente.

Las infecciones por *M. avium-intracellulare* son extremadamente resistentes y requieren terapia múltiple. Se ha intentado el tratamiento con combinaciones de azitromicina o claritromicina como fármaco base, más etambutol como segundo fármaco y rifabutina, rifampicina, ciprofloxacina o ampicacina (Mangura et ál, 1994).

2.4. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS

En el proceso diagnóstico rutinario en el laboratorio de micobacterias es necesario seguir unas pautas características en la microscopía directa, el cultivo y la identificación, definidas por las peculiares propiedades de las micobacterias respecto a su composición química y su velocidad de crecimiento extremadamente lenta.

2.4.1. Microscopía directa

La microscopía directa es el método más rápido, sencillo y económico para la detección presuntiva de bacilos ácido-alcohol resistentes en las muestras clínicas (Huebner et ál, 1993). Puede realizarse por tinción de las improntas siguiendo el método de Ziehl-Neelsen, o con un fluorocromo. Los fluorocromos, como la auramina (Richards et ál, 1941; Smithwick, 1976) o el naranja de acridina (Smithwick et ál, 1976) permiten detectar más fácilmente las micobacterias, examinando un área mayor en menos tiempo (Kent et ál, 1985). Las bacterias se ven como bacilos delgados, a menudo con aspecto de una sarta corta de abalorios.

Las posibilidades de encontrar bacilos en las improntas aumenta conforme lo hace su concentración en la muestra. Para que puedan ser detectadas es necesario que haya más de 10^4 micobacterias en cada ml de muestra (Yeager et ál, 1967; Rouillon et ál, 1976; Bates, 1979). El número de micobacterias en las muestras depende de varios factores: la especie involucrada, el estadio de la enfermedad y el hospedador; suele ser bajo en las infecciones ocasionadas por *M. bovis* en vacuno y caprino, pero mayor en ciervos y tejones, etc... *M. avium* suele aparecer en gran número en las improntas de tejido, y su morfología es más variable que la de *M. bovis*. Las especies de micobacterias no pueden ser diferenciadas por microscopía. Además, la microscopía es menos sensible que el cultivo, por lo que el diagnóstico definitivo debe basarse en la identificación del microorganismo a partir de la muestras clínica.

2.4.2. Cultivo e identificación tradicionales

a. Cultivo

Para el aislamiento de las micobacterias debe tenerse en cuenta que no todas poseen los mismos requerimientos nutricionales, ni la misma velocidad de crecimiento, pero en casi todos los casos es un proceso lento y tedioso, que requiere el uso de medios específicos.

El agente de la lepra humana, *M. leprae*, no puede ser cultivado *in vitro*, utilizándose para su estudio en el laboratorio la inoculación en armadillos y ratones (Shepard et ál, 1965).

M. paratuberculosis, productor de la paratuberculosis de los rumiantes solo puede ser cultivado en medios enriquecidos con micobactinas. Las especies aisladas más frecuentemente, *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium*, poseen requerimientos nutricionales complejos y necesitan un tiempo de incubación superior a las 2 a 6 semanas. Las micobacterias de crecimiento rápido no precisan factores nutricionales especiales.

El cultivo de micobacterias puede realizarse a partir de diversas muestras: aspirados de cavidades, biopsias, esputos, orina, leche, etc..., siendo necesario seguir un protocolo que permita la recuperación selectiva de estos microorganismos. La licuefacción con cloruro de benzalconio y la digestión por homogenización del mucus o el tejido liberan las micobacterias y facilita la acción de las sustancias descontaminantes. La mayoría de las muestras contienen también microorganismos de crecimiento rápido, aunque su carga depende en gran medida de su naturaleza y de la forma en que fue recolectada. Las bacterias no ácido-alcohol resistentes pueden alterar el pH, modificar con sus enzimas la composición de los medios y enmascarar con su crecimiento el de las micobacterias.

Aprovechando la resistencia de las micobacterias a determinados productos químicos debe realizarse una descontaminación previa de la muestra. Entre estas sustancias se incluyen el ácido oxálico al 5% (Lesslie et ál, 1970; Claxton et ál, 1979), ácido sulfúrico al 4% (Thorel, 1982), NaOH al 2-4% (Vestal, 1975; Rogers et ál, 1980; Shane et ál, 1993), 1% NaOH-3% laurilsulfato sódico (SDS) (Tacquet et ál, 1961; Tacquet et ál, 1965), 2% N-acetil-L-cisteína (NALC)-1-3% NaOH (Kubica et ál, 1963; Kubica et ál, 1964; Kent, 1985), fosfato de Zefiran trisódico (Z-TSP), y cloruro de hexadecilcetilpiridinio (HPC) (Corner et ál, 1988; Corner et ál, 1995), compuestos a los que las micobacterias son relativamente resistentes.

El tiempo de exposición a los agentes descontaminantes debe ser cuidadosamente controlado, debido a que la resistencia de las micobacterias no es absoluta (Krasnow et ál, 1969). Estos descontaminantes son parcialmente tóxicos (Vestal, 1975; Kent, 1985), e incluso en condiciones óptimas un 80 o 90% de las micobacterias de la muestra pueden ser destruidas (Corner et ál, 1995). Se considera que el tratamiento con SDS es más apropiado que el NALC, NaOH y Z-TSP, y que la tasa de contaminación es menor (Salfinger et ál, 1987). El

Z-TPS es más destructivo para las micobacterias no tuberculosas que el resto de los productos (Yajko et ál, 1993). El HPC al 0,75% es tan efectivo en el control de contaminantes como el NaOH al 2%, y es menos tóxico, por lo que se considera el descontaminante de elección (Corner et ál, 1995; Liébana et ál, 1995).

Puesto que las micobacterias están presentes en bajo número en las muestras, éstas deben ser concentradas para facilitar su detección. Esta concentración suele realizarse por centrifugación. 3.000 g aplicadas durante 15 minutos, o 2.500 durante 20 minutos es suficiente (Ratnam et ál, 1986).

A continuación las muestras descontaminadas se siembran en los medios de cultivo que las micobacterias investigadas requieran. Los medios pueden tener base de agar, como los de Middlebrook (Dubos et ál, 1947; Cohn et ál, 1968; Gallagher et ál, 1977) y el B83 (Cousins et ál, 1989), o de huevo, como Stonebrinks (Stonebrink, 1958; Lesslie, 1959), Löwestein-Jensen (Löwenstein, 1931; Jensen, 1932) y Coletsos (Coletsos, 1960). Estos últimos contienen verde malaquita (aproximadamente 0.025 g/100 ml) como agente selectivo, asimismo algunos medios incorporan antibióticos (lincomicina, cicloheximida y ácido nalidíxico) para hacerlos más selectivos. Algunas micobacterias, como *M. tuberculosis* y *M. avium*, requieren glicerol para su crecimiento, que sin embargo, inhibe el crecimiento de *M. bovis*, el cual se ve estimulado por un 0,4% de piruvato sódico. Los medios utilizados para el aislamiento de las organismos pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* suelen estar preparados en pico de flauta y en botellas cerradas a rosca.

Los medios recomendados para algunas cepas de *M. avium* aisladas de aves y de mamíferos y que requieren micobactinas para su crecimiento son el medio de Stuart enriquecido con albúmina bovina y 3 µg/ml de micobactina de *M. phlei* (Stuart, 1965) y el medio de Watson-Reid (Watson, 1935; Thorel et ál, 1987).

No existe una opinión generalizada del medio que ofrece mejores resultados (Stager et ál, 1991; Wilson et ál, 1995; Anagyros et ál, 1990). La mejor opción es siempre una combinación de medios que obtengan la mayor sensibilidad en el cultivo.

Las temperaturas óptimas de crecimiento también varían ampliamente dependiendo de las especies, estando generalmente comprendidas entre 30° y 45°C. Su crecimiento es lento o muy lento, con tiempos de generación que oscilan según las especies entre 2 y más de 20 horas (David, 1973), por lo que las colonias de algunas especies necesitan hasta 8 semanas para ser visibles. El lento crecimiento y la actividad bioquímica de las micobacterias puede ser debida, en parte, a la naturaleza hidrofóbica de estas bacterias asociada a su alto contenido en lípidos, así como también a su relativamente baja producción de ARN polimerasa y baja proporción de ARN respecto del ADN. Se calcula que la sensibilidad del cultivo de estos microorganismos es 10^2 bacilos en cada ml de muestra (McFadden et ál, 1990).

b. Identificación

Las características morfológicas macroscópicas de las micobacterias varían ampliamente, y la mayor parte de las especies forman más de un tipo de colonia, dependiendo también de la composición del medio (Lévy-Frébault et ál, 1992). Las colonias de algunas especies, como *M. tuberculosis*, suelen ser normalmente rugosas, duras y de color beis; mientras que otras, como *M. intracellulare*, son comúnmente lisas.

La identificación por métodos convencionales incluye numerosas pruebas bioquímicas diferentes, según estén destinadas a la caracterización de especies de crecimiento lento o rápido. Algunas cepas pueden tener tasas de crecimiento intermedias, por lo que existen ciertas características útiles para su identificación, como el crecimiento en presencia de 5% de NaCl (Kestle et ál, 1967), el crecimiento con 0,2% de ácido pícrico (Tsukamura, 1965; Tsukamura, 1967), la utilización del succinato, malato y fumarato como fuente de carbón y del fumarato y glutamato como fuente de carbono y nitrógeno (Tsukamura, 1976), y el uso de hierro y la prueba de la tinción de microcolonias.

Aunque las micobacterias comparten rutas metabólicas comunes a otros miembros bacterianos, se emplean pruebas bioquímicas desarrolladas específicamente para los miembros de este género, adaptadas a su lento metabolismo. El Grupo Internacional de Taxonomía de las Micobacterias (*International Working Group on Mycobacterial Taxonomy*, IWGMT) propuso las pruebas para utilizar en la sistemática de este género y para la realización de

matrices de taxonomía numérica (porcentaje de pruebas con el mismo resultado del número total de pruebas realizadas) del grupo de las micobacterias de crecimiento lento (Meissner et ál, 1974; Wayne et ál, 1974; Tsukamura, 1976; Wayne et ál, 1976; Wayne et ál, 1978; Wayne et ál, 1980; Wayne et ál, 1981, Wayne et ál, 1983; Wayne et ál, 1984; Wayne et ál, 1989; Wayne et ál, 1991), y del grupo de las micobacterias de crecimiento rápido (Kubica et ál, 1972; Saito et ál, 1977).

Las pruebas más frecuentemente utilizadas son el crecimiento a distintas temperaturas (25, 30, 33, 37, 42 y 45°C), pigmentación, producción de niacina (Konno, 1956; Runyon et ál, 1959), reducción de nitratos (Virtanen, 1960), tolerancia al 5% de NaCl (Kestle et ál, 1967; Kubica, 1973), desaminación de pirazinamida (Wayne, 1974), producción de ureasa (Murphy et ál, 1975; Steadham, 1979), crecimiento en agar MacConkey sin cristal violeta (Jones et ál, 1964; Kubica et ál, 1974), inhibición por la hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH) 2 µg/ml (Harrington et ál, 1966; Vestal et ál, 1967), inhibición por el ácido p-nitrobenzoico (500 µg/ml) utilización de la arilsulfatasa (Kubica et ál, 1961; Whitehead et ál, 1953), hidrólisis del Tween 80 (Wayne et ál, 1964) y producción de catalasa (Kubica et ál, 1966). La principal desventaja de este tipo de pruebas es el tiempo excesivamente largo (hasta 2 semanas) que requieren en su realización debido al lento crecimiento y baja actividad de las micobacterias, y que las condiciones de realización de estas pruebas son críticas para la reproducibilidad de los resultados, los cuales pueden variar drásticamente dependiendo de la concentración del sustrato, composición del tampón, tiempo de reacción, etc..., por lo que en cada batería de pruebas deben incluirse cultivos de referencia (Lévy-Frébault et ál, 1992).

El aislamiento e identificación mediante inoculaciones en animales de experimentación, basadas en la diferencia de patogenicidad de las micobacterias en conejos, cobayas y pollos, no se utiliza actualmente por razones éticas y económicas.

En las baterías de pruebas empleadas para taxonomía numérica de micobacterias, se tiende a asociar en el mismo grupo (complejo o *complex*), especies con porcentaje de similitud igual o superior al 85% (Tsukamura, 1976). En general, y excluyendo algunas excepciones, existe buena correspondencia entre el agrupamiento de especies por pruebas

bioquímicas y por criterios independientes, tales como análisis antigénico por inmunodifusión e inmunolectroforésis, especificidad de pruebas dérmicas, separación inmunológica de proteínas seleccionadas y homología ADN/ADN. Por esta última técnica se ha comprobado que el ADN de los miembros del complejo *M. tuberculosis* presentan homologías superiores al 86% (Grosskinsky et ál, 1989) y que *M. paratuberculosis* es prácticamente indistinguible de *M. avium* (McFadden et ál, 1987).

En algunos casos no es necesario completar la identificación hasta especie; por ejemplo, para el diagnóstico clínico puede ser suficiente identificar un organismo como perteneciente a un complejo formado por microorganismos de similar significación, ya que en estas ocasiones, la complejidad de las pruebas necesarias para la identificación puede sobrepasar el valor de la información obtenida.

2.5.3. Nuevos métodos de cultivo e identificación

Aunque las características del cultivo y las pruebas bioquímicas son definitivas en la identificación, existen nuevas técnicas de diagnóstico descritas en estos últimos años con la finalidad de subsanar los inconvenientes del diagnóstico tradicional: (1) los sistemas de detección radiométrica (Bactec TB system), (2) la cromatografía líquida de alta resolución, (3) las sondas de ácidos nucleicos y (4) la reacción en cadena de la polimerasa.

a. Sistemas de detección radiométrica

El cultivo radiométrico BACTEC (Becton Dickinson) utiliza un medio de cultivo líquido (7H12) que contiene ácido palmítico marcado con C^{14} (Middlebrook et ál, 1977). Este ácido graso es metabolizado por las micobacterias en su crecimiento y convertido en CO_2 marcado. La conversión está calibrada para medir el índice de crecimiento de *M. tuberculosis* (Cummings et al, 1975; Middlebrook et ál, 1977). El medio puede incluir PANTA (polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim y azlocilina) para controlar la contaminación (Siddiqi et ál, 1986). A partir de estos cultivos puede emplearse para la identificación preliminar de micobacterias añadiendo p-nitroaminohidroxipropiofenona (NAP) que inhibe el crecimiento del complejo *M. tuberculosis*, obteniendo el diagnóstico en una media de 17

días (Stager et ál, 1991), y para el estudio de la sensibilidad a los antibióticos.

Este sistema detecta la presencia de micobacterias en una muestra clínica, reduciendo la obtención de cultivo a 7-16 días (Takahashi et ál, 1983; Anagyros et ál, 1990), y a 14-24 días las muestras negativas en la tinción, aproximadamente en la mitad de tiempo que los medios sólidos. En general, las tasas de cultivo con BACTEC son superiores (Morgan et ál, 1983; Roberts et ál, 1983; Park et ál, 1984; Kirihaara et ál, 1985). Sin embargo, el número de contaminaciones es mayor (5-10%) que con los medios convencionales (1-4%) (Salfinger et ál, 1987; Anagyros et ál, 1990). Sus principales inconvenientes son el costo elevado y la utilización de un isótopo radiactivo.

b. Cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) estudia los ácidos micólicos específicos de especie o complejo. El análisis por HPLC de las muestras derivatizadas produce un patrón característico. La utilización de programas de ordenador simplifica el procedimiento (Glickman et ál, 1994), pero su realización requiere un equipo considerable y un alto grado de conocimientos técnicos, por lo que solamente es apropiado para grandes laboratorios de referencia.

c. Sondas de ácidos nucleicos

Este método se basa en la reasociación de ADN heterólogo u homólogo desnaturizado. Las sondas comerciales para micobacterias Accuprobe system (Gen-Probe Inc, San Diego, CA) utilizan oligonucleótidos sintéticos monocatenarios marcados con un producto quimioluminiscente y complementarios al ARN ribosómico, presente en aproximadamente 10^4 copias en cada célula. Estos se unirán formando un híbrido ADN:ARN (McFadden et ál, 1990). Las sondas actuales utilizan un ester de acridinio (quimioluminiscente) que produce luz en presencia de peróxido y un pH elevado (Goto et ál, 1991). Hay sondas disponibles para los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium-intracellulare*. Se aplica para la identificación de cultivos obteniendo una sensibilidad entre el 95,2 (Lebrun et ál, 1992) y el 98% (Musial et ál, 1987); ahorrando entre 3 y 8 semanas, pero carece de la sensibilidad necesaria para la detección directa de micobacterias a partir de muestras clínicas,

ya que requiere la presencia de 3×10^7 bacilos en cada prueba (Pao et ál, 1988).

d. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) (Saiki et ál, 1985; Mullis et ál, 1987) permite la amplificación de secuencias específicas de ADN, generando millones de copias a partir de una sola molécula de ADN. Es un método simple que provee alta sensibilidad en la detección, al menos semejante a la del cultivo, combinada con la especificidad de las sondas. En un primer paso, el ADN es desnaturalizado a 94°C. En un segundo paso, bajo condiciones experimentales adecuadas, los iniciadores (*primers*) de la reacción, oligonucleótidos de 15 a 30 pares de bases (p.b.), hibridan en secuencias del genoma conocidas y separadas de 100 a 2000 p.b. del ADN diana o molde. Cada iniciador se une a una cadena, con sus extremos 3' apuntándose entre sí. La temperatura de esta hibridación depende de la longitud de los iniciadores y de su proporción en G+C; en cualquier caso, a más temperatura la especificidad de la reacción es mayor. En el tercer paso, el fragmento del ADN localizado entre los iniciadores es rápidamente amplificado utilizando una enzima polimerasa de ADN procedente de la bacteria *Thermus aquaticus*, que actúa a 72°C. Esta amplificación se lleva a cabo añadiendo desoxinucleótidos trifosfato, complementarios a la cadena de ADN molde, en los extremos 3' de los iniciadores. Por lo tanto, el fragmento de ADN se duplica en cada ciclo, obteniéndose una copia de cada una de las cadenas. La reacción vuelve a repetirse 30 o 35 ciclos, obteniendo replications sucesivas.

Al finalizar 35 ciclos, la cantidad de ADN es teóricamente 2^{35} , aunque la saturación de la enzima, la hibridación del ADN diana y otros factores limitan la amplificación. Sin embargo, el rendimiento obtenido con esta reacción es suficiente, y el producto de la reacción puede ser detectado por hibridación (0,3 pg de ADN) o por electroforesis en gel de agarosa con tinción de bromuro de etidio (1-10 ng) (McFadden et ál, 1990). La sensibilidad extremadamente alta de la técnica obliga a tomar precauciones para evitar la aparición de falsos positivos debido a contaminaciones, especialmente con producto de PCR (Kwok et ál, 1989).

La PCR puede aplicarse en un amplia variedad de muestras (cultivo puro, tejidos,

líquidos biológicos) para detección de enfermedades hereditarias, tumores, microorganismos y en medicina forense. En todos los casos requiere que las células que contienen el ADN que va a ser amplificado estén lisadas para liberar su genoma, por lo que es necesario el desarrollo de un método de extracción del ADN adecuado a cada muestra. Precisa también conocer la secuencia de ADN específica para la elección de los iniciadores y la puesta a punto de las condiciones óptimas para cada reacción, tanto respecto a los reactivos (concentraciones de iniciadores, polimerasa, deoxinucleótidos trifosfato, $MgCl_2$ y tampón de la reacción) como a la temperatura, duración de cada paso y número de ciclos (Innis et ál, 1990).

La utilización de la PCR, asociada al análisis de restricción enzimática, permite la separación de micobacterias y nocardias (Lungu et ál, 1994), así como la identificación de especies mediante la diferenciación de los patrones generados por restricción enzimática con *HaeIII* de los fragmentos del gen que codifica la proteína de choque térmico de 65 kDa (*HSP*) amplificados. Esta técnica ha sido aplicada a micobacterias crecedoras lentas (Plikaytis et ál, 1992; Telenti et ál, 1993; Vaneechoutte et ál, 1993) y rápidas (Steingrube et ál, 1995).

La reacción en cadena de la polimerasa se ha utilizado para el diagnóstico rápido de patógenos de crecimiento lento (Guatelli et ál, 1989; Moser et ál, 1989; Van Eys et ál, 1989), así como para la identificación de cultivos y la detección de microorganismos del complejo *M. tuberculosis* a partir de muestras humanas (A. Brisson-Noël et ál, 1989; Boddington et ál, 1990; Cousins et ál, 1991; Eisenach et ál, 1991; Buck et ál, 1992), pero ha sido raramente utilizada para la detección de *M. avium* (Kim et ál, 1994). Aunque el procedimiento es muy sensible en cultivos, su sensibilidad es bastante menor a partir de muestras clínicas, especialmente tejidos (Wards et ál, 1995).

Las secuencias de ADN utilizadas en este trabajo son específicas del género *Mycobacterium* (gen que codifica el ARN ribosómico) y de los miembros del complejo *M. tuberculosis* (gen que codifica la MPB70 y secuencia de inserción IS6110).

Gen que codifica el ARN ribosómico

Las secuencias del ARN ribosómico (ARNr) están altamente conservadas entre los

procariotas. El análisis comparativo de estas secuencias revela tramos de secuencias muy conservadas y otros variables (Woese, 1987). Son características de casi cada microorganismo, y han sido utilizadas para establecer relaciones filogenéticas entre especies bacterianas (Woese et ál, 1983; Lane et ál, 1985), así como para la identificación de microorganismos (Grimont et ál, 1986; Göbel et ál, 1987; Rossau et ál, 1989). Las regiones menos conservadas en la evolución de las micobacterias son objetivos potenciales para sondas específicas de género o de especie (Böddinghaus et ál, 1990).

Las micobacterias de crecimiento rápido tienen dos copias de los genes ARNr en el cromosoma, mientras que las micobacterias de crecimiento lento únicamente tienen una copia (Bercovier et ál, 1986). Este bajo número de copias puede ser una de las razones del lento crecimiento de las micobacterias (Bercovier et ál, 1986), ya que otros procariotas, cuyo crecimiento es mucho más rápido que el de las micobacterias, tienen varias copias del operon del ARNr (por ejemplo, *Escherichia coli* tiene 7, *Clostridium perfringens* 9). El orden de los genes en estas bacterias es idéntico al de otros procariotas, 5'-promotor-16S-23S-5S-3', (Brosius et ál, 1981; Bercovier et ál, 1986). Entre las secuencias que codifican el 16S y el 23S, y entre el 23S y el 5S, existen espaciadores o secuencias intergénicas. Estas regiones espaciadoras están sometidas a menor presión selectiva en la evolución, por lo que varían más que las secuencias de los genes con papel funcional (Barry et ál, 1991). Las variaciones existentes entre organismos son una fuente de secuencias específicas de especie, sin embargo, estas secuencias no permiten diferenciar entre los distintos componentes del complejo *M. tuberculosis* (Glennon et ál, 1994).

El conocimiento de la secuencia de nucleótidos del gen que codifica el ARNr 16S de muchas micobacterias, mediante secuenciación directa del gen (Suzuki et ál, 1988) o de fragmentos generados por transcriptasa inversa a partir del ARNr 16S (Smida et ál, 1988), permitió revelar que aunque todas las micobacterias pertenecen a la rama de los actinomicetos, las especies de crecimiento lento y rápido están bien separadas filogenéticamente (Smida et ál, 1988). Entre las especies de crecimiento lento, una media del 96% de las secuencias son homólogas, indicando un estrecho grupo (Smida et ál, 1988).

Según los experimentos realizados por Böddinghaus y sus colaboradores en 1990, existen varias regiones del ARNr 16S variables en las micobacterias. Una región altamente variable en las eubacterias, correspondiente a las posiciones 161 a 213 de *E. coli* (la numeración IUB), es una posible región específica de especie, ya que la alineación de las secuencias muestra pequeñas diferencias entre las especies investigadas: complejo *M. tuberculosis* (las secuencias de todos los miembros del complejo son idénticas), grupo *M. avium* (incluyendo *M. paratuberculosis*), *M. kansasii* (*M. gastri*, *M. simiae* y *M. scrofulaceum*), *M. chelonae*, *M. smegmatis*, *M. marinum*, *M. fortuitum*, etc...

Algunas regiones son específicas de género y muestran al menos dos bases diferentes al compararlas con otras secuencias del ARNr 16S publicadas (Dams et ál, 1988), incluyendo secuencias de especies pertenecientes al grupo *Corynebacterium-Nocardia-Actinomyces*. Éstas son la región 414 (posiciones en *E. coli* 212 a 230), región 247 (590 a 609), región 266-267 (614 a 633), región 260 (988 a 1007) y región 264 (1027 a 1046). Las dos últimas están perfectamente conservadas en todas las especies de micobacterias y no aparecen en otros microorganismos (Böddinghaus et ál, 1990), por lo que los oligonucleótidos complementarios de estas secuencias pueden ser utilizados como iniciadores para amplificaciones específicas de género. La combinación de éstos con un iniciador complementario de una secuencia común del ARNr 16S, por ejemplo el oligonucleótido 246 (Edwards et ál, 1989), produce una banda con el tamaño esperado en presencia de ADN de micobacterias (Böddinghaus ál, 1990). Este método ha sido utilizado para la identificación de cultivos (Wilton et ál, 1992) y para el diagnóstico de tuberculosis a partir de muestras clínicas humanas (Cousins et ál, 1992). Los iniciadores MYCGEN-F, oligonucleótido universal 246, y MYCGEN-R, inverso y complementario de la secuencia 264 (Böddinghaus et ál, 1990) amplifican un fragmento de 1.030 p.b.

Gen que codifica la MPB70

La proteína de secreción MPB70 fue aislada por primera vez a partir de *M. bovis* BCG (Nagai et ál, 1981). Es secretada por las cepas de *M. bovis*, por lo que aparece predominantemente en las preparaciones de cultivos filtrados (Harboe et ál, 1984; Abou-Zeid et ál, 1986), siendo un importante antígeno en los preparaciones de PPD a partir de *M. bovis*.

El peso molecular de la proteína estimado por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes es 18-23 KDa, aunque su motilidad parece ser anómala (Haslov et ál, 1987; Fifis et ál, 1989). El análisis con anticuerpos monoclonales demuestra que contiene al menos 3 epítomos (Wood et ál, 1988).

El gen que codifica la MPB70, de 673 nucleótidos, fue secuenciado en el curso de una investigación sobre los epítomos específicos para su utilización en el diagnóstico serológico de la tuberculosis bovina (Radford et ál, 1990). Según la secuencia obtenida, el tamaño de la proteína es menor (16 KDa). No se conoce la función biológica de ésta proteína, ni se ha relacionado su nivel de producción con ninguna característica de *M. bovis*, tampoco existe similitud con otras proteínas conocidas de donde pueda inferirse (Radford et ál, 1990). La amplificación de ADN con dos oligonucleótidos dirigidos a éste gen ha sido utilizada para la identificación de cultivos (Cousins et ál, 1991). Los iniciadores utilizados, TB-1F y TB-2R generan un producto de 372 p.b., que se detectó en todos los miembros del complejo *M. tuberculosis* (Cousins et ál, 1991).

Secuencia IS6110 (elementos móviles de ADN)

Los elementos móviles son secuencias de ADN capaces de excindirse e integrarse en numerosos lugares del cromosoma, cambiando de posición de un lugar a otro dentro del genoma, o desde éste a elementos extracromosómicos o bacteriófagos, independientemente de los sistemas del hospedador. Estos elementos se han encontrado en la mayoría de los organismos estudiados; muchos contienen genes que confieren resistencia a antibióticos, determinantes de patogenicidad y resistencia a metales pesados o enzimas. Un tipo especial de elementos móviles son los transposones (Tn), piezas de ADN que pueden alcanzar varios miles de p.b., que incluyen genes de resistencia a antibióticos, y que se clasifican según el tipo de resistencia que confieren.

Los elementos móviles más pequeños son las secuencias de inserción (IS). Su tamaño varía entre 800 y 2.500 p.b. (están clasificadas por tamaño en *IS1*, *IS2*, *IS3*, etc...). Se encuentran, en número muy variable, tanto en bacterias Gram-positivas, Gram-negativas como en Arqueas, estando presentes en el cromosoma, plásmidos y bacteriófagos. Las secuencias

de inserción contienen las funciones necesarias para la transposición y secuencias cortas, repetidas e invertidas, en sus extremos. Algunas secuencias de inserción forman parte de transposones que proporcionan resistencia a antibióticos. Algunos de estos elementos no tienen un lugar específico de inserción y se integran aleatoriamente en el cromosoma, otros tienen puntos específicos de integración, llamados "*hot spots*". Se han propuesto varios mecanismos para explicar la transposición; la transposición replicativa y la transposición conservadora (Pato, 1989). En algunos casos se ha demostrado que las secuencias de ADN repetitivas son específicas de especie.

Se conocen diversos elementos móviles en las micobacterias. El *Tn610*, aislado de *M. fortuitum* (Martín et ál, 1990), confiere resistencia a sulfonamidas; contiene un fragmento central homólogo a las secuencias de los transposones de la familia *Tn21*, y está flanqueado por dos *IS6100* relacionadas con la familia *IS6*. La *IS900*, relacionada con la familia *IS110*, hallada en una cepa de *M. paratuberculosis* aislada de un paciente con la enfermedad de Crohn, aparece de 15 a 20 veces en esta especie (McFadden et ál, 1987; Green et ál, 1989). La *IS901* (Kunze et ál, 1991) y la *IS1245* se encuentran en algunas cepas de *M. avium* (Bono et ál, 1995).

La *IS6110* se aisló a partir de la cepa de *M. tuberculosis* H37rv (Thierry et ál, 1990). Está relacionada con la *IS3411*, una secuencia de inserción de un transposón de *E. coli*, el *Tn3411*, con genes para la utilización del citrato (Ishiguro et ál, 1988). La *IS6110* tiene 1.361 p.b. y en sus extremos incluye una repetición de 28 p.b. complementarias e invertidas, 3 mal emparejadas, así como otras 3 p.b., probablemente del ADN diana, con repetición directa (Thierry et ál, 1990). Esta estructura es homóloga a la encontrada en *IS3411* e *IS3* (Timmerman et ál, 1985; Prère et ál, 1990). Contiene además 2 marcos o zonas de lectura abierta ("*orf*" u "*open reading frame*") similares a los de *IS3411*. Se ha detectado en los microorganismos del complejo *M. tuberculosis*, pero no en micobacterias no pertenecientes a éste, incluyendo *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, etc... (Thierry et ál, 1990; Plikaytis et ál, 1991). El elemento *IS986*, aislado de *M. tuberculosis* (Zainuddin et ál, 1989; McAdam et ál, 1990) y el *IS987* de *M. bovis* (Hermans et ál, 1991) difieren solamente en escasos p.b., por lo que son considerados el

mismo elemento.

Experimentos realizados mediante Southern blotting con ADN hidrolizado con diversas enzimas de restricción (*Sall*, *PstI*, *EcoRI*, *BamHI*, etc..) han demostrado que las cepas de *M. tuberculosis* y *M. microti* contienen de 10 a 20 copias de *IS6110*, mientras que *M. bovis* y *M. bovis* BCG contienen únicamente una o dos (Thierry et ál, 1990). *M. africanum* es intermedio entre los anteriores y tiene de 6 a 9 copias (Plikaytis et ál, 1991). Las copias de *IS6110* se encuentran repartidas por todo el cromosoma. Diversos grupos investigadores han utilizado este elemento para la identificación de micobacterias a partir de cultivos (Plikaytis et ál, 1991), con fines diagnóstico a partir de muestras humanas (Thierry et ál, 1990) y de muestras animales (Liébana et ál, 1995; Aranaz et ál, 1996). También se utiliza en epidemiología siguiendo un protocolo recomendado estandarizado con el objetivo de permitir la comparación de los resultados de varios laboratorios, y seguir el rastro de cepas de especiales características, tales como multirresistencia (van Embden et ál, 1993).

3. EL COMPLEJO TUBERCULOSIS

El complejo *M. tuberculosis* incluye cinco especies, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti* y *M. africanum*, productoras de la tuberculosis de los mamíferos. Esta división en especies sigue un criterio epidemiológico, ya que los componentes de este grupo de microorganismos pueden considerarse variantes de *M. tuberculosis*. Es probable que puedan encontrarse más tipos que hayan evolucionado en determinadas áreas geográficas o en hospedadores particulares (Collins et ál, 1983).

Tabla I.5. Características de los microorganismos pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* (Damsker et ál, 1974; Collins et ál, 1983; Cousins et ál, 1994; Grange et ál, 1994).

Variedad	PO	NO ₃	TCH	PZ	N	CP	PC	PCb
<i>M. tuberculosis</i> variedad clásica	A	+	R	S	+	-	-	+
<i>M. tuberculosis</i> variedad asiática	A	+	S	S	+	-	-	+
<i>M. africanum</i> variedad I	M	-	S	S	V	+	V	+
<i>M. africanum</i> variedad II	M	+	S	S	V	+	V	+
<i>M. bovis</i> variedad clásica	M	-	S	R	-	+	+	+
<i>M. bovis</i> BCG	A	-*	S	R	-	-	-	-
<i>M. microti</i>	A	-	S	ND	+	+	-	-
Dassie bacillus	A	-	S	ND	+	+	-	-

PO, Preferencia de oxígeno; A, aeróbio; M, microaerófilo

NO₃, reducción de nitratos; +, reacción positiva; - reacción negativa, -, algunas cepas son débilmente positivas

ND, no descrito

PZ, pirazinamida; S, sensible; R, resistente

TCH, hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico

N, producción de niacina, V, variable

CP, estimulación del crecimiento en presencia de piruvato

PC, patógeno en el conejo

PCb, patógeno en el cobaya.

Todos los miembros del complejo *M. tuberculosis* forman una única especie, ya que comparten una homología de ADN entre el 85 y el 100% (Imaeda, 1985; Wayne et ál, 1987; Grosskinsky et ál, 1989), y varias regiones de su genoma (ADN que codifica para el ARNr

16S, espaciadores de transcripción del ADNr 16S al 23S y gen *dnaJ*) están totalmente conservadas (Frothingham et ál, 1994; Kirschner et ál, 1993; Takewaki et ál, 1994). La separación en especies ha sido cuestionada por varios investigadores basándose, además de en la homología del ADN (Bradley, 1972; Baess, 1979), en la taxonomía numérica utilizando 88 características diferentes (Tsukamura, 1976, David et ál, 1978) y en la inmunodifusión (Standford et ál, 1974). La tipificación del ADN (*fingerprinting*) mediante análisis de restricción enzimática e hibridación con sondas, capaz de diferenciar entre cepas, no es capaz de discriminar entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* (van Soolingen et ál, 1992; van Soolingen, 1994).

Varias especies de micobacterias contienen distintas variantes que difieren en sus propiedades bioquímicas y en su virulencia para los animales de experimentación. La gran importancia de *M. tuberculosis* como patógeno ha llevado a separar estas variedades intraespecíficas como especies. Sin embargo, para otros autores, las diferencias de *M. tuberculosis* y *M. bovis* en el crecimiento, las pruebas bioquímicas y la patogenicidad para ciertos hospedadores (Wayne, 1982; Bates et ál., 1993), junto con la necesidad de distinguir ambas infecciones, son suficientes para diferenciarlas en especies independientes, aunque estrechamente relacionadas (Karlson et ál, 1970).

3.1. *Mycobacterium tuberculosis*

Se considera que una cepa pertenece al complejo *M. tuberculosis* si es crecedora lenta (requiere más de siete días para producir colonias visibles en un medio con base de huevo e incubado a 37°C), no produce pigmentación y no crece en medios con huevo que contengan ácido paranitrobenzoico (500 µg/ml) o incubados a 25°C (Marks, 1976).

Los primeros criterios para diferenciar las cepas de micobacterias productoras de la tuberculosis humana y bovina fueron la morfología de los bacilos, la tasa de crecimiento *in vitro*, la patogenicidad para varios animales y la supresión del crecimiento en presencia de glicerol en contraste con el estímulo en las cepas humanas (Smith, 1904). En posteriores informes se describió el crecimiento de las cepas humanas abundante, mientras que el de las

colonias de las cepas bovinas era pequeño y plano, denominando a ambos eugónico y disgónico, respectivamente. En medio líquido sin agente dispersante, las cepas humanas crecían en superficie y las bovinas no formaban esta película.

Posteriores investigaciones permitieron el descubrimiento de propiedades que permitían su diferenciación, incluyendo (1) la preferencia de oxígeno, las cepas humanas son aeróbicas, las bovinas son microaerófilas (Lebek, 1959), (2) la reducción de nitratos, las cepas humanas son capaces de reducir los nitratos a nitritos, mientras que no las bovinas (Virtanen, 1960), (3) la actividad nicotinamidasas y pirazinamidasas, las cepas humanas hidrolizan ambas amidas, pero no las bovinas (Bönicke et ál, 1958), y puesto que esta actividad es necesaria para el efecto antibacteriano (Konno et ál, 1967), las cepas bovinas son resistentes a éste, (4) las bacilos humanos producen niacina, pero no los bovinos (Konno, 1956), y (5) la diferente susceptibilidad a la hidrazida del ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH), que inhibe el crecimiento de las cepas bovinas pero no el de las cepas humanas (Yates et ál, 1979; Collins et ál, 1982).

Ninguna de estas pruebas puede ser utilizada como única fuente de diferenciación de *M. bovis* y *M. tuberculosis*, y para obtener un resultado fiable debe utilizarse una combinación de éstas (Collins et ál, 1983). Las pruebas que se admiten para la diferenciación de ambos incluyen la preferencia de oxígeno, el tipo de colonias y la presencia o ausencia de crecimiento en medios con TCH (5 µg/ml) y pirazinamida (60 µg/ml), la reducción de nitratos y el efecto del glicerol y el piruvato sódico en el crecimiento. El cultivo del material infectado requiere ocho semanas, y las pruebas para la identificación de los aislados otras seis semanas (Corner et ál., 1988).

La amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del fragmento *mtp40* (Parra et ál, 1991), supuestamente específico de *M. tuberculosis*, ha sido descrita para la diferenciación de esta especie del resto de los componentes del complejo (Sinclair et ál, 1995). Sin embargo, este fragmento se ha detectado también en *M. africanum* y en las micobacterias pertenecientes a este complejo aisladas de pinnípedos (Liébana et ál, 1996).

La variedad asiática de *M. tuberculosis* se diferencia de la variedad clásica en que la

primera es susceptible al peróxido de hidrógeno, es sensible al TCH, posee un lípido característico en su pared celular, es más resistente al ácido paraaminosalicílico y a la tiacetazona, y es menos virulenta para los cobayas (Grange et ál, 1977; Grange et ál, 1978).

3.2. *Mycobacterium bovis*

A pesar de haber sido utilizado con anterioridad para referirse a las cepas productoras de la tuberculosis bovina, el nombre *M. bovis* no fue reconocido oficialmente hasta 1970 (Karlson et ál, 1970). La cepa tipo es la ATCC 19210, aislada por W.D. Yoder de un granuloma de un nódulo linfático de ternera en 1965.

La variedad clásica de *M. bovis* se denominó inicialmente europea, aunque no está restringida a Europa. Además de las variedades clásicas existen cepas sensibles a la pirazinamida, principalmente aisladas a partir de pacientes asiáticos y africanos, por lo que fueron denominadas como *M. bovis* variedad afroasiática (Marks, 1976). Esta misma denominación fue utilizada para las cepas microaerófilas sensibles a la pirazinamida y al TCH aisladas de emigrantes de las mismas etnias, aunque algunas eran capaces de degradar los nitratos (Yates et ál., 1979).

La prueba de la inmunoperoxidasa realizada con el anticuerpo monoclonal murino 4C3/17 (Agen Biochemical Ltd), y en un segundo paso con un anticuerpo IgG anti-ratón conjugado con peroxidasa, detecta específicamente suspensiones muy diluídas de *M. bovis* (Corner et ál, 1988). El anticuerpo 4C3/17 reconoce un epítipo especie-específico de *MPB70*, una proteína de 22 kDa que es un antígeno mayor de *M. bovis* (Veerman et ál, 1990). La proteína *MPB70* es detectable en una concentración muy baja en *M. tuberculosis* y en algunas cepas de *M. bovis* BCG (Harboe et ál, 1984).

Otros procedimientos de identificación, cromatografía en capa fina (TLC) (Jarnagen et ál, 1983), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Butler et ál, 1991), polimorfismo de los fragmentos de ADN tras una restricción enzimática e hibridación con ácidos nucleicos (RFLP) (Hermans et ál., 1990), no discriminan adecuadamente o son lentos

y de difícil realización.

3.3. *Mycobacterium africanum*

El término *M. africanum* fue utilizado por primera vez como una variante geográfica del bacilo responsable de la tuberculosis humana aislado en África ecuatorial (Castets et ál, 1969). Es un grupo de cepas con propiedades intermedias entre los tipos humano y bovino (Meissner et ál, 1969), bastante heterogéneo, que podría representar un espectro continuo entre las cepas humana y bovina (Prat et ál, 1974). Las cepas de *M. africanum* tienden a formar dos grupos: las cepas sin la capacidad de reducir los nitratos o variedad africana I, predominante en el oeste de África, y las reductoras o variedad africana II, predominantes en el este de África (David et ál, 1978; Collins et ál, 1982). Aunque estas cepas africanas parecen variantes de *M. bovis* no existe ninguna evidencia de que estén relacionadas con el ganado (Collins et ál, 1982).

3.4. *Mycobacterium bovis* BCG

M. bovis BCG (Bacilo Calmette-Guérin) es una cepa de *M. bovis* atenuada por sucesivos cultivos en medio con patata, bilis y glicerol. Se han mantenido subcultivos de esta cepa original en diferentes laboratorios durante décadas, produciéndose una deriva genética que ha originado diferentes cepas (Grange et ál, 1983). En función de su crecimiento en cobayas y ratones, dependiendo de la multiplicación en el punto de inoculación y la diseminación al bazo desde los ganglios linfáticos, se clasifican en fuertes (cepas Pasteur y Copenhagen) y débiles (Glaxo).

Posee el crecimiento y la morfología de *M. tuberculosis*, y las características bioquímicas y sensibilidad a los antibióticos característicos de *M. bovis* (Blattner, 1964; Karlson et ál, 1970; Marks et ál, 1971). *M. bovis* BCG puede ser diferenciada mediante tipificación del ADN con el marcador IS1081 (van Soolingen et ál, 1992), por HPLC (Floyd et ál, 1992) y por restricción enzimática con *BanI* de la región *major polymorphic tandem repeat* (MPTR) (Frothingham, 1995).

M. bovis BCG es administrada en los países en vías de desarrollo a los recién nacidos, y es un vehículo potencial para la presentación de antígenos de múltiples patógenos (Stover et ál, 1991). Existen algunas descripciones de infecciones diseminadas por BCG en pacientes inmunodeprimidos (Centers for Disease Control, 1986; Armbruster et ál, 1990; Edwards et ál, 1994).

3.5. *Mycobacterium microti*

M. microti fue el nombre específico (Reed, 1957) para denominar al bacilo aislado en 1937 en los campañoles (*Microtus agrestis*), inicialmente denominado "*vole bacillus*". Estos ratones campestres presentaron lesiones con áreas caseosas en el tejido subcutáneo, pulmones y ganglios linfáticos. El material caseoso contenía un gran número de bacilos ácido-alcohol resistentes.

El crecimiento y su morfología fue similar al de *M. tuberculosis*. Una emulsión del microorganismo inoculada en diversos animales de experimentación permitió reproducir la enfermedad (Wells et al., 1937). Los resultados a las pruebas bioquímicas son semejantes a los de *M. bovis*, pero no producen niveles detectables de la proteína MPB70, el antígeno característico de *M. bovis* (Cousins et al., 1994).

3.6. *Micobacteria aislada de los damanes (dassie bacillus)*

Otra micobacteria perteneciente al complejo es el "*dassie bacillus*" aislado en Sudáfrica en 1954 a partir de un granuloma epiteliode encontrado en el damán roquero (*Procavia capensis*), conocido localmente como *dassie*, reproduciendo la enfermedad al inyectar material de los pulmones afectados conteniendo un bacilo ligeramente pleomórfico y granulado (Wagner et ál, 1958). El cultivo, inhibido en medios con glicerol (Smith, 1960), producía dos tipos de colonias tras una larga incubación (Wagner et ál, 1961). No se observó *cord factor* en la tinción (Wagner et ál, 1961). Las lesiones producidas en animales de experimentación fueron semejantes a las producidas por *M. microti*, pero bastante menos severas, considerándose, en función de sus características morfológicas y biológicas una

variante casi avirulenta de esta especie (Wagner et ál, 1958). La misma infección se diagnosticó en una colonia de damanes en un zoo australiano (Cousins et ál, 1994).

3.7. Micobacteria aislada de las focas (*seal bacillus*)

Un microorganismo del complejo *M. tuberculosis* se ha aislado también de lesiones tuberculosas en focas. Esta micobacteria, identificada como *M. bovis* según las puebas bioquímicas, pero con un débil cord factor y tolerante al glicerol, no produce el antígeno MPB70 (Cousins et ál, 1990).

4. EL COMPLEJO *M. avium-intracellulare*

Mycobacterium avium es una micobacteria de crecimiento lento y su temperatura óptima es 37°C. Las colonias pueden ser lisas o rugosas, y su morfología puede cambiar en el subcultivo del primer aislamiento del material patológico. La mayoría de las cepas son no cromógenas, pero pueden tomar color amarillo al envejecer. Las células son bacilos o cocabacilos. No produce niacina, peroxidasa, nitrito-reductasa y son resistentes a la hidracida del ácido 2-tiofenocarboxílico y a la isonicida.

Aunque es esencialmente una saprofita ambiental, puede ser potencialmente patógena, siendo agente etiológico de enfermedad en aves y mamíferos, incluyendo el hombre (Grange et ál, 1990; Wayne et ál, 1992). El término complejo *M. avium-intracellulare* (MAI) incluye *M. avium* y *M. intracellulare* basándose en las características morfológicas y bioquímicas, ya que no pueden ser diferenciados por pruebas bioquímicas o por su comportamiento en el cultivo (Meissner et ál, 1974). La seroaglutinación (Schaefer, 1965; Scaefers, 1980; McClatchy, 1981; Good et ál, 1984) realizada con células completas y suero policlonal obtenido en conejos, fue la forma original de identificación de las serovariedades, y es todavía utilizada (Denner et ál, 1992). Estos antígenos son glicopeptidolípidos, formados por una fracción invariable lipopeptídica y un oligosacárido variable (Brennan et ál, 1979).

Los estudios de hibridación de ADN y de la utilización de sondas específicas confirman que ambas son dos especies diferentes (Baess, 1983; Saito et ál, 1989) que no se corresponden con la clasificación de los serotipos (Wolinsky et ál, 1973; Baess, 1983; Saito et ál, 1989). *M. avium* incluye los serotipos 1-6, 8-11 y 21. Algunos aislados que originalmente estaban clasificados como *M. intracellulare* están considerados actualmente *M. avium*.

Las cepas de *M. intracellulare* se agrupan en tres subespecies: subespecie 1 (serotipos 12 a 17 y 19, 20 y 25), subespecie 2 (serotipo 7), y subespecie 3 (serotipo 18). Los serotipos 7 y 18 presentan secuencias diferentes en el ARNr (Saito et ál, 1989). Otros serotipos (23, 24, 26 y 28) permanecen sin determinar. Algunas cepas reaccionan con dos o tres sueros y la serotipificación de otras es imposible (McClatchy et ál, 1981; Schaefer, 1980; Grange et

ál, 1990).

El alto grado de homología del ADN entre *M. avium* y otras dos micobacterias, *M. paratuberculosis* y el bacilo aislado de las palomas torcaces (*wood pigeon bacillus*), sugiere que estos organismos deben agruparse como biovariedades de una especie única (Hurley et ál, 1988; Saxegaard et ál, 1988; Yoshimura et ál, 1988). Los nombres propuestos son *M. avium* subespecie *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *M. avium* subsp. *silvaticum*, respectivamente (Thorel et ál, 1990). Esta separación, basada en características del cultivo y de una prueba bioquímica está correlacionada con la patogenicidad y hospedador en que se encuentra (Thorel et ál, 1990). La utilidad de estos criterios de discriminación puede verse alterada en el caso de cepas subcultivadas, debido a la adaptación a un medio particular.

M. avium subespecie *avium* es ubicua en el ambiente, y es el agente asociado más comúnmente con la tuberculosis aviar y la causada en mamíferos y en el hombre. La cepa tipo es la ATCC 25291. Crecen en medios con huevo, no necesitan micobactina, y el pH ácido no estimula su crecimiento. Las colonias son lisas y las células suelen ser cocobacilos.

M. avium subsp. *paratuberculosis* requiere micobactina (2 mg/litro) para su cultivo. Se caracteriza por producir colonias rugosas, crecer en medio con base de huevo, estimulado por el piruvato, tolerar la D-cicloserina (50 µg/ml), y no producir fosfatasa alcalina. No se ha aislado del ambiente, es patógena obligada para rumiantes, estando implicada en la paratuberculosis o enfermedad de Johne (Merkal, 1984) y en la enfermedad de Crohn en los seres humanos (McFadden et ál, 1987; Chiodini, 1989). La cepa tipo es la ATCC 19698.

M. avium subsp. *silvaticum* necesita micobactina para su aislamiento primario, es incapaz de crecer en medio con base de huevo, y su crecimiento se ve estimulado a pH 5.5. No se ha encontrado en el medio ambiente, y causa tuberculosis en aves y en rumiantes (McDiarmid, 1948; Matthews et ál, 1979; Collins et ál, 1985). La cepa tipo es la 6409 (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Paris, nº 103317).

M. avium produce tuberculosis en probablemente todas las especies de aves, pero la

predisposición y la respuesta varía considerablemente entre las familias (Montali et ál, 1992) y los serotipos implicados (Grange et ál, 1990). Las infecciones producidas por MAI afectan también a cerdos, caballos, ganado vacuno y caprino, perros, gatos, primates, marsupiales y animales de laboratorio (Lepper et ál, 1983; Thoen et ál, 1984). La enfermedad plantea problemas especialmente en mamíferos de zoo, probablemente relacionados con condiciones de vida estresantes (Grange et ál, 1990).

En seres humanos, el complejo MAI se ha asociado con tres cuadros clínicos principales: (1) la linfaadenitis localizada primaria (ganglios linfáticos cervicales de niños), (2) infección pulmonar, relacionada con condiciones predisponentes, y (3) infección diseminada, normalmente asociada a una inmunosupresión (Grange et ál, 1986). *M. avium* es una de las infecciones asociadas al síndrome de la inmunodeficiencia humana adquirida más frecuente, con una significativa morbilidad y tiempo de supervivencia reducidos (Snider et ál, 1987; Horsburgh et ál, 1991). Las variedades predominantes son los serotipos 1, 4, y 8 (Good, 1985; Mangura et ál, 1994). Aunque la infección se debe casi exclusivamente a un limitado grupo de cepas de *M. avium* y por razones prácticas todas las infecciones se consideran de origen ambiental, el potencial zoonótico real de *M. avium* no ha sido determinado (Crawford, 1994).

MAI vive libremente en el ambiente, especialmente cuando existe una contaminación con heces de animales infectados, en aguas superficiales y en el suelo, en donde es capaz de resistir largos periodos de tiempo (Grange et ál, 1990), pudiendo además colonizar las conducciones de agua (Collins et ál, 1984). Sin embargo, los aislados clínicos de MAI presentan diferentes propiedades (sensibilidad a la estreptomycin y contenido en plásmidos) que los encontrados en el agua (Fry et ál, 1986; Meissner et ál, 1986).

La fuente de la infección con *M. avium* no ha sido completamente determinada, y su hallazgo en el ambiente y en varias especies animales sugiere la existencia de varios posibles reservorios. La secuencia de inserción IS901 (Kunze et ál, 1991), codifica para una secuencia de aminoácidos similar a la de IS900 de *M. paratuberculosis* (McFadden et ál, 1987). La presencia o ausencia de esta secuencia diferencia *M. avium* en dos grupos. La mayoría de las

cepas estudiadas de *M. avium* aisladas de animales contienen este elemento repetitivo en su genoma. Todas estas cepas, denominadas A/I, presentan un patrón muy similar mediante RFLP con esta sonda, indicando que es muy estable. Sin embargo, no se encontró esta secuencia en las cepas tipo A, aisladas de pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana, en los que causa enfermedad diseminada, ni en cepas obtenidas del medio ambiente. Los serotipos de las cepas A fueron mayoritariamente 4, 6 y 8 (Kunze et ál, 1992). Las cepas tipo A fueron avirulentas para el ratón BALB/c, que si fue susceptible a las cepas A/I (Kunze et ál, 1991). En contraste con el anterior, un estudio posterior ha demostrado la ausencia de la secuencia IS901 en cepas de origen porcino (Bono et ál, 1995). El RFLP con la secuencia IS1245 es también característico de cada población, las cepas de *M. avium* aisladas de aves presentan tres copias, mientras que las obtenidas de cerdos y personas al menos siete (Bono et ál, 1995). Los mismos resultados se obtuvieron mediante electroforesis en campo pulsátil (*pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE) (Bono et ál, 1995).

El diagnóstico laboratorial de las infecciones por *M. avium* plantea las mismas limitaciones asociadas con el diagnóstico de la tuberculosis, incluyendo el lento crecimiento de los microorganismos y la realización de las pruebas bioquímicas para la identificación de los aislados (Crawford, 1994). La recogida de muestras para el diagnóstico microbiológico debe ser realizado cuidadosamente para evitar una contaminación ambiental que podría enmascarar el resultado laboratorial. Ya que pueden encontrarse en el ambiente, el aislamiento de microorganismos del complejo *M. avium-intracellulare* no está necesariamente correlacionado con enfermedad (Schaefer et ál, 1973), por lo que es siempre necesaria la opinión del clínico.

5. PATOGÉNESIS

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad, natural o producida experimentalmente, están influenciadas por: (1) la ruta de infección o inoculación, (2) factores derivados del hospedador, principalmente la calidad de la respuesta inmune desarrollada, (3) la virulencia de la cepa de microorganismo, y (4) la dosis recibida (Thoen et ál, 1986; Griffin, 1989; Neill et ál, 1994).

Las especies animales varían respecto a la susceptibilidad a la infección por las diferentes micobacterias, encontrándose considerables discrepancias en cuanto al número de bacilos en las lesiones, composición celular de éstas, grado de formación de caseo, fibrosis y calcificación, y sensibilidad a la tuberculina (Thoen, 1994). Existe una correlación inversa entre el número de bacilos en las lesiones y el grado de hipersensibilidad de tipo retardado en las diferentes especies animales (Francis, 1958; Thorns et ál, 1982). Es probable que las diferencias genéticas demostrables mediante análisis de restricción enzimática no tengan un significado epidemiológico en cuanto a la transmisión de la enfermedad; es posible que los factores ecológicos (densidad de población, interacciones entre especies, diferencias en el habitat) sean enteramente responsables de la presencia o ausencia de un reservorio en un país, más que la adaptación fisiológica de *M. bovis* a un nuevo hospedador (Morris et al., 1994).

La resistencia genética del hospedador a *M. bovis* nunca ha podido ser demostrada de forma concluyente. Existen diferencias entre algunas familias de conejos de laboratorio en cuanto a la respuesta a la inoculación experimental y el desarrollo de las lesiones (Wells et ál, 1941). Recientemente se ha aislado en el ratón un gen autosómico (Bcg), prácticamente homólogo a gen humano *Nramp* (*natural resistance associated macrophage protein*) que controla la susceptibilidad a varias especies de micobacterias y a otros parásitos intracelulares. La expresión fenotípica de este gen está relacionada con una activación inespecífica de los macrófagos, produciendo en las primeras etapas de la infección una destrucción de los microorganismos fagocitados (Schurr, 1991).

También influyen otros factores no específicos, como la edad, la raza y el sistema de producción. Los animales jóvenes desarrollan lesiones más severas que los adultos; el ganado

zebú es más resistente que las razas europeas (Biberstein et ál, 1990). La enfermedad es más frecuente en vacas lecheras debido al hacinamiento, mayor periodo de vida y estrés productivo (Biberstein et ál, 1990). Sin embargo, los rebaños para producción cárnica pueden verse afectados con alta morbilidad si entran animales infectados y comparten el mismo bebedero (Blood et ál, 1989). En los seres humanos, el estrés y los cambios fisiológicos pueden también afectar, y la gestación puede aumentar la susceptibilidad a las infecciones por micobacterias (Rich, 1951; Griffin, 1989). En las vacas este efecto es dudoso, aunque sí se ve alterada la respuesta al diagnóstico basado en la inmunidad celular (Buddle et ál, 1994), ya que el parto puede deprimir esta respuesta (Kerr et ál, 1946; Kehrli et ál, 1989).

La virulencia de la cepa depende de una serie de complejas interacciones entre los microorganismos y el hospedador (Collins, 1994). Los bacilos producen una serie de "factores de virulencia", algunos asociados a lípidos de la pared celular, que le permiten contrarrestar las defensas del hospedador, multiplicándose en el punto de entrada antes de su diseminación a otros órganos. Cuanto más virulenta sea una cepa, durante más tiempo continuará creciendo en el pulmón, aunque comience una resistencia en otros órganos (Collins, 1985).

La dosis de infección afecta a la distribución y severidad de las lesiones. La administración experimental via intratraqueal de dosis altas de *M. bovis* (5×10^5 ufc) origina tras 6 meses extensas lesiones en el pulmón y en los ganglios linfáticos de la cabeza, tórax y abdomen. En este grupo de animales se encuentran elevados títulos de anticuerpos. La administración de dosis bajas (500 ufc) produce predominantemente lesiones pequeñas, localizadas en el pulmón y en sus ganglios linfáticos, similares a las vistas en el ganado infectado de manera natural (Buddle et ál, 1994).

5.1. RUTAS DE INFECCIÓN

Las rutas de infección dependen de factores como la edad, el ambiente y las prácticas ganaderas (Lepper et ál, 1973; Neill et ál, 1994). Aunque no siempre es sencillo deducir la vía de entrada de los microorganismos por los hallazgos anatomopatológicos, las evidencias *postmortem* sugieren que la vía aerógena es la más importante (Dungworth, 1985; Pritchard,

1988; Blood et ál, 1989). En las inspecciones en los mataderos, el 57% de los animales presentaban lesiones tuberculosas confinadas en los ganglios linfáticos bronquiales y mediastínicos, el 23% tenían lesiones exclusivamente en los ganlios retrofaríngeos y submaxilares, un 4,7% en ambas localizaciones, y únicamente el 3,2% de los animales tenían lesiones en los ganglios mesentéricos (Neill et ál, 1994). La vía aerógena, facilitada por el natural comportamiento del ganado vacuno, se ve favorecida por la alta densidad de los animales (McIlroy, 1986). La mayoría de los casos de tuberculosis bovina se adquieren por inhalación de los microorganismos en aerosoles y polvo, por lo que el complejo primario se localiza habitualmente en el pulmón y en los ganglios linfáticos (bronquiales o mediastínicos) asociados. En el examen *postmortem* la mayoría de los animales reactivos a la tuberculina mostraron lesiones en el lóbulo caudal del pulmón, siendo el diámetro del 70% de éstas menor de 1 centímetro (McIlroy et ál, 1986).

Es probable que la infección via digestiva sea más común en condiciones de clima templado que permitan la diseminación y la supervivencia de *M. bovis* en los pastos o en el heno (Lepper et ál, 1973). Las lesiones intestinales no son frecuentes en la actualidad en los países desarrollados, en los que los programas de erradicación aseguran la eliminación de los animales tuberculosos antes de la diseminación del microorganismo. Las lesiones en los ganglios linfáticos mesentéricos se establecen por ingestión de esputos regurgitados contaminados o por la ingestión de leche infectada.

Las vías digestiva y respiratoria son las rutas de infección más comunes, pero no las únicas (Lepper et ál, 1983; Pritchard, 1988). La infección cutánea se debe a la contaminación de lesiones primarias con las micobacterias, y suele limitarse al punto de entrada y al ganglio linfático regional. La infección congénita se debe a la transmisión a través de los vasos umbilicales. El complejo primario se desarrolla en el hígado y en los ganglios linfáticos portales; la diseminación de la infección es rápida, y origina la muerte en pocas semanas. La transmisión venérea puede producirse si existe infección de los órganos genitales del macho o la hembra. La infección intramamaria puede producirse a través de la ordeñadora (Blood et ál, 1989).

5.1.1. Excreción de *M. bovis*

Han existido diferentes criterios sobre la infecciosidad de los animales tuberculosos. Dependiendo de las lesiones encontradas en el matadero los animales pueden clasificarse en casos abiertos o cerrados, según se estime si son capaces o no de diseminar la infección. Los casos abiertos presentan tuberculosis miliar o lesiones caseificadas y no encapsuladas. Las zonas de bronconeumonía o hiperemia alrededor de las lesiones pulmonares sugieren también enfermedad activa. Por el contrario, las lesiones cerradas están caseificadas y a menudo calcificadas y rodeadas por una densa cápsula fibrosa (Timoney et ál, 1988; Blood et ál, 1989). El ganado con lesiones en los nódulos linfáticos respiratorios no es considerado capaz de eliminar microorganismos si no hay lesiones pulmonares concomitantes (Gallagher, 1980). El tipo de lesión ganglionar de caracter exudativo o proliferativo es indicativo de la extensión de la enfermedad, siendo más peligrosas las lesiones de caracter exudativo.

Otros autores sostienen que la mayoría del ganado infectado elimina bacilos directamente desde los pulmones (Stamp, 1948). Los animales en los que no se detectan lesiones en el pulmón, aunque si en los ganglios linfáticos, podrían ser erróneamente considerados no infectivos en un examen rutinario. Sin embargo, un detallado examen *postmortem* es capaz de detectar lesiones en el 70% de los animales reactivos, de los que un 20% pueden eliminar *M. bovis* en el mucus nasal o traqueal (McIlroy et ál, 1986). Por lo tanto, todos los animales que reaccionan positivamente a la tuberculina deben ser considerados excretores, e importantes fuentes de infección para el resto del rebaño (McIlroy et ál, 1986).

El aislamiento de *M. bovis* a partir de secreciones del tracto respiratorio oscila entre el 6 y el 20% de los animales muestreados (Rempt, 1954; Neill et ál, 1988; de Kantor et ál, 1989). En infecciones naturales via respiratoria, *M. bovis* puede ser detectado en el mucus nasal 80 días postinfección (Neill et ál, 1991). El inicio, la duración y el nivel de la excreción de *M. bovis* en animales experimentalmente infectados depende de la dosis de inoculación (Neill et ál, 1988).

La transmisión de los animales salvajes a los animales domésticos ocurre

principalmente por contacto entre especies durante las fases de comportamiento atípico de los animales infectados (Morris et al., 1994).

5.1.2. Supervivencia de *M. bovis* en el medio ambiente

M. bovis es un patógeno obligado pero puede sobrevivir en el medio ambiente en condiciones favorables durante variables periodos de tiempo. La supervivencia de *M. bovis* depende directamente de las condiciones ambientales: temperatura, exposición a la luz solar (dsecación, rayos ultravioletas), disponibilidad de nutrientes en la materia orgánica, humedad, pH y microflora concurrente (Wray, 1975, Kelly et ál, 1978). La capacidad contaminante de las heces está relacionada con el tiempo de supervivencia de *M. bovis* en las mismas, así como con las medidas higiénicas que se apliquen para su eliminación (Vera et ál, 1980). *M. bovis* puede sobrevivir en heces expuestas al sol de 37 a 43 días en época de lluvia y 71 a 84 días en época seca. Esta supervivencia se duplica si se mantiene a la sombra (Vera et ál, 1982). En secreciones de tejón, este organismo puede sobrevivir en orina de 3 a 14 días en verano y de 28 a 70 días en invierno (Anon, 1979). La persistencia de *M. bovis* en los animales muertos es de 2 a 6 semanas (Little et ál, 1982), pudiendo ser una fuente de infección para los animales carroñeros. En general, la contaminación de los pastos no es importante en la transmisión de la infección, ya que la dosis oral infectiva es alta, y la persistencia de los organismos baja (Morris et ál, 1994).

5.2. LA RESPUESTA INMUNE

El conocimiento de la respuesta inmune en la tuberculosis bovina ha sido adaptado, ya que la mayoría de los estudios de inmunología frente a las micobacterias estan realizados con células humanas y *M. tuberculosis*, o utilizando el ratón como animal modelo. Se conoce muy poco sobre las funciones y propiedades de la respuesta inmune en otras especies animales.

La respuesta inmune frente a la tuberculosis es una espada de doble filo (Barnes et ál, 1994) en la que intervienen intrincadas interacciones entre los linfocitos de los fenotipos

helper y supresor, la madurez de los macrófagos de las lesiones, y la modulación ejercida por las citoquinas (Krahenbuhl, 1995; Riley, 1996).

Las relaciones entre las micobacterias y los hospedadores son complejas (Chaparas, 1982; Edwards et ál, 1986; Piessens, 1989; Kaufmann, 1990). Después de que los linfocitos T han reconocido los antígenos de las micobacterias procesados en las células presentadoras de antígenos, se desarrolla una inmunidad mediada por células (*cell-mediated immunity*, CMI) (Mackaness, 1964). Esta interacción produce la activación de los macrófagos a través de las citoquinas liberadas por las células T, pudiendo decirse que las consecuencias clínicas de la infección dependen de la eficacia de esta CMI, más que de la inmunidad humoral. Aunque los neutrófilos y las *natural killer* tienen efecto micobacteriostático *in vitro*, su papel *in vivo* es todavía incierto.

El comienzo y curso clínico de la enfermedad representa una complicada lucha entre el patógeno y el hospedador, alternando fases de remisión y exacerbación. El desenlace depende en gran medida del éxito de los bacilos en el interior de los macrófagos (Riley, 1996). En un primer estadio, los macrófagos alveolares pueden destruir los bacilos antes de su crecimiento o éstos empezarán a multiplicarse en una lesión granulomatosa incipiente formada por macrófagos. Posteriormente, el desarrollo de la CMI decidirá el desarrollo de la infección. Pueden encontrarse bacilos viables extracelulares en el material caseoso del centro de tubérculo y bacilos intracelulares en los márgenes del granuloma, cuyo destino depende de la actividad de los macrófagos. La inmunidad no previene que se establezca la infección, pero limita el progreso de la misma una vez establecida.

En los pequeños focos persisten los microorganismos en forma de infección latente (Jubb et ál, 1980). La CMI puede dejar bacilos encapsulados en una lesión durante largos periodos de tiempo, permitiendo una fuente de reactivación posterior si existiese un inmunocompromiso (estrés, tratamiento con esteroides, etc...) (Wiegshauss et ál, 1989). La tuberculosis reactivada es idéntica a la primaria en su sintomatología e infecciosidad (Saliers et ál, 1994). En el último estadio el centro del granuloma puede licuarse, originando un inmenso crecimiento extracelular de bacilos. La formación de cavernas y la destrucción de

los tejidos permite su paso al árbol bronquial y su transmisión en forma de aerosoles al medio (Krahenbuhl, 1995).

5.2.1. El papel de los fagocitos mononucleares

El desarrollo de las enfermedades por micobacterias depende de la habilidad de estos microorganismos para sobrevivir y multiplicarse en los tejidos e inducir una respuesta inmune (Thoen et ál, 1986). Cuando los aerosoles que contienen los microorganismos son inhalados al pulmón, éstos son fagocitados por los macrófagos alveolares. El sistema mononuclear fagocitario es una línea de células originada en la médula ósea que pasa a la circulación (monocitos) y finalmente se transforma en macrófagos en los tejidos (macrófagos de las cavidades pleural y peritoneal, de los nódulos linfáticos, células de Kupffer, macrófagos alveolares, etc...). Los macrófagos constituyen la segunda línea de defensa del organismo. Su fagocitosis es lenta y la degradación del material fagocitado es menos completa que la de los neutrófilos. Pueden fagocitar materias solubles y partículas, y producen y secretan una gran cantidad de sustancias que regulan la respuesta hematopoyética, inmune e inflamatoria (Nathan, 1987). La parálisis de los macrófagos por saturación con material particulado produce graves infecciones (Cheville, 1988).

Son las células presentadoras de antígeno (*antigen-presenting cell*, APC) efectivas en su interacción con los linfocitos T, ya que pueden degradar, procesar y presentar los antígenos relevantes para la estimulación de la CMI en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex*, MHC) de clase II (Krahenbuhl, 1995). La expresión de los antígenos por esta ruta promueve la proliferación de los linfocitos CD4⁺, la población celular central para el desarrollo de la inmunidad adquirida frente a la tuberculosis (Barnes et ál, 1994).

La capacidad antibacteriana de este sistema fagocitario depende de su localización en los tejidos y de la activación por estímulos exógenos. Los macrófagos tisulares tienen una capacidad antimicobacteriana limitada, y permiten la colonización y la multiplicación del patógeno intracelular (Baümmler et ál, 1995). La activación (estimulación con citoquinas) de

los macrófagos modifica numerosas propiedades bioquímicas, fenotípicas y funcionales, especialmente su capacidad microbicida. Los macrófagos activados se diferencian de las formas inactivas por un mayor número de lisosomas, fagosomas y mitocondrias (Youmans, 1979) y son los realizadores esenciales en la protección frente a las enfermedades producidas por las micobacterias (Edwards et ál, 1986; Thoen et ál, 1986; Pritchard, 1988). Así, mientras que un macrófago normal permite el crecimiento intracelular del microorganismo, los activados inhiben o matan el patógeno que inició la respuesta CMI y un amplio espectro de microorganismos intracelulares (Krahenbuhl et ál, 1980).

Las linfoquinas son esenciales para la activación de los macrófagos (Edwards et ál, 1986; Dannenberg, 1989). La linfoquina clave que activa los macrófagos es probablemente el interferón-gamma (IFN- γ) (Nathan et ál, 1983). El IFN- γ potencia las rutas de varias funciones efectoras de los macrófagos, como la producción de radicales de oxígeno y nitrógeno, el catabolismo del triptófano, y la limitación de hierro intracelular. El tratamiento con IFN- γ reduce el crecimiento y la supervivencia intracelular de *M. bovis* y *M. tuberculosis* (Flesch et ál, 1987; Rook et ál, 1987; Flesch et ál, 1988).

5.2.2. Mecanismos microbicidas de los macrófagos

Las rutas metabólicas y principales funciones efectoras que caracterizan a los macrófagos activados son la elevada producción de reactivos intermediarios de oxígeno (*reactive oxygen intermediates*, ROI) (Nathan et ál, 1977; Murray et ál, 1985), y de reactivos intermediarios del nitrógeno (*reactive nitrogen intermediates*, RNI) (Drapier et ál, 1988), la acidificación del fagosoma, la fusión del fagosoma con el lisosoma y la producción de defensinas (peptidos antibacterianos) (Baümler et ál., 1995).

Las diferencias observadas entre las distintas cepas de micobacterias en las respuestas frente a los mecanismos antimicobacterianos pueden ser responsables de las diferencias observadas en el curso clínico de la enfermedad tras las infecciones, ya que es probable que también existan éstas entre los aislados clínicos (Riley, 1996).

a. La fagocitosis

En la membrana plasmática de los macrófagos existen diversos receptores que median en la fagocitosis. El nivel de expresión de estos receptores varía durante el ciclo vital de las células: (1) el receptor de la fracción Fc (FcR), (2) los receptores de los factores C3b del complemento (CR) y (3) el receptor de la manosa (*macrophage mannose receptor*, MMR) (Baümler et ál, 1995). Para varios microorganismos la entrada en las células esta mediada por más de un tipo de receptor. Los CRs (CR1, CR3 y CR4) intervienen en la fagocitosis de *M. tuberculosis* (Schlesinger et ál, 1990) y *M. leprae* (Schlesinger et ál, 1990; Hirsch et ál, 1994). *M. avium* y *M. tuberculosis* también entran en la célula por medio de los MMR (Bérmudez et ál, 1991; Schlesinger, 1993). Las cepas virulentas y avirulentas pueden tener diferentes rutas de entrada que influyen su supervivencia en el interior de los macrófagos. Así, el MMR es trascendental en la adherencia de cepas virulentas de *M. tuberculosis* a los macrófagos, pero no en las atenuadas (Schlesinger, 1993). Los macrófagos activados presentan menos CR y MMR que los macrófagos normales; este hecho puede ser responsable de que los macrófagos activados contengan menos microorganismos (Esparza et al., 1986; Firestein et al., 1987).

b. La fusión fagosoma-lisosoma

Tras la ingestión por los macrófagos, los patógenos son secuestrados en el interior de los fagosomas, en donde su posterior supervivencia está supeditada a su habilidad para evadir la muerte y la degradación debida a las enzimas contenidas en los lisosomas del hospedador. *M. tuberculosis* bloquea o detiene parcialmente el proceso de maduración de los fagosomas; en el fagosoma están presentes la transferrina (marcador endosomal temprano) y moléculas del MHC de clase I y II; pero el nivel de incorporación de las glicoproteínas (marcadores endosoma-lisosomales tardíos) es muy variable, y no aparecen los receptores de manosa-6-fosfato (marcadores tardíos) (García-del Portillo et ál, 1995). Los estadios iniciales de la formación de los fagosomas que contienen *M. bovis* y *M. avium* no han sido estudiados.

La supervivencia y crecimiento de *M. tuberculosis* en el interior de los macrófagos varía dependiendo de las cepas; en macrófagos de ratón, *M. tuberculosis* H37Rv prolifera fácilmente tras 1 o 2 semanas de infección, mientras que *M. tuberculosis* H37Ra disminuye

al 20% del inóculo en la primera semana, pero alcanza el número inicial en la segunda, y el 90% de *M. bovis* BCG es destruido en 2 semanas (Armstrong et ál, 1971). La fusión fagosoma-lisosoma se observa en un 30% de los microorganismos de la cepa H37Rv; en macrófagos de animales tratados con suero anti-BCG la fusión se incrementó, alcanzando el 75%; sin embargo, los bacilos en el interior de los fagolisosomas seguían siendo viables (Armstrong et ál, 1975).

Las diferentes cepas de *M. tuberculosis* exhiben diferentes respuestas respecto a los fagolisosomas. Otro mecanismo por el que los patógenos evitan los efectos de los fagolisosomas es escapar de éstos (Moulder, 1985). Todas las micobacterias son fagocitadas en pocas horas y en un porcentaje alto; y el descenso en el número de fagolisosomas se debe a la huída de algunas cepas (H37Rv y H37Ra) vía unas vesículas; sin embargo, las micobacterias no viables y *M. bovis* BCG permanecen en los fagolisosomas (McDonough et ál, 1993). La cepa H37Rv puede multiplicarse en el interior de estas vesículas, o permanecer libre en el citoplasma; sin embargo, H37Ra y *M. bovis* BCG no se replican (McDonough et al., 1993) y no se encuentran libres en el citoplasma (Myrvik et ál, 1984).

c. La acidificación del fagosoma

La acidificación del fagosoma (alcanzando valores de pH de 4,5 a 5) se debe probablemente a una bomba de protones, similar a una adenosin trifosfatasa (ATPasa), y es necesaria para la actividad óptima de enzimas liberadas por el lisosoma. Se ha observado que los fagosomas que contienen micobacterias son menos acídicos que otros fagosomas (Gordon et ál, 1980; Crowle, 1991). Esta bomba de protones podría ser selectivamente excluída de la membrana fagosomal, o los fagosomas podrían fusionarse selectivamente con lisosomas que no contienen esta bomba (García-del Portillo et ál, 1995). Además, la capacidad de *M. tuberculosis* de liberar glutamina sintetasa y producir amoniaco obstaculiza la acidificación del fagosoma (Gordon et ál, 1980).

d. El contenido lisosomal

Los lisosomas contienen numerosas enzimas degradativas, incluyendo hidrolasas, proteasas y lisozima. Previo a la fusión con el lisosoma, el pH del fagosoma desciende a un

nivel ácido, permitiendo la actividad óptima de las enzimas lisosomales. Los microorganismos que permanecen viables en el interior de los fagolisosomas han desarrollado mecanismos para prevenir la acidificación, inhibir o inactivar las enzimas lisosomales, o han elaborado superficies resistentes a éstas (Moulder, 1985). *M. tuberculosis* y otras micobacterias parecen ser viables en los fagosomas (Thoen et ál, 1986), limitándose el papel de estas enzimas a la destrucción de los microorganismos muertos (Armstrong et ál, 1975; Baümler et ál, 1995). Sin embargo, incluso los bacilos muertos son capaces de resistir la degradación por las enzimas (Stahelin et ál, 1956).

En las décadas de los años 50 y 70 varios investigadores describieron con el microscopio electrónico una zona electrotransparente, de 50 a 100 nm de espesor, que rodeaba las micobacterias intracelulares (Yamamoto et ál, 1958; Drapier et ál, 1970; D'Arcy Hart et ál, 1972; Draper et ál, 1973). Esta zona electrotransparente (*electron-transparent zone*, ETZ) se observó exclusivamente en las micobacterias asociadas con enfermedad, sugiriendo una función protectora frente a las enzimas lisosomales (Draper et ál, 1970), pero su papel en la supervivencia intracelular permanece sin ser definitivamente demostrado (Riley, 1996).

e. Los reactivos intermediarios de oxígeno (ROI)

La activación de los macrófagos y la fagocitosis mediada por el FcR están asociadas con una ruta respiratoria que produce ROI a partir de la reducción parcial del oxígeno. La enzima responsable es una oxidasa que utiliza como sustrato el NADPH, convirtiendo el oxígeno molecular en ROI. Los principales son el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Smith et ál, 1991). Estos radicales de oxígeno causan daños letales en el ADN o en la membrana y son microbicidas (Murray et ál, 1979; Nathan et ál, 1983). Los macrófagos activados con IFN- γ tienen una mayor capacidad de producir ROI (Nathan et ál, 1983).

Los constituyentes de las micobacterias que neutralizan los efectos tóxicos de los ROI son importantes factores de virulencia. Casi todas las células aerobias (procariotas y eucariotas) contienen enzimas para eliminar estas especies químicas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa y peroxidasa, y enzimas para reparar el ADN. Las micobacterias están

provistas de glicolípidos complejos que pueden eliminar estos radicales (Chan et ál, 1989; Chan et ál, 1991). La susceptibilidad de *M. tuberculosis* a la muerte por los macrófagos activados no está relacionada a la sensibilidad al peróxido de hidrógeno, ya que contienen catalasa. Los mecanismos dependientes del oxígeno no son importantes en la inhibición de la supervivencia intracelular de *M. tuberculosis* (Flesch et ál, 1991; Riley, 1996).

f. Los reactivos intermediarios del nitrógeno (RNI)

El aminoácido L-arginina actúa como sustrato de una sintetasa en la producción de óxido nítrico (NO). Posteriormente, este NO es rápidamente oxidado a NO_2^- y NO_3^- . Estos radicales son potentes moléculas efectoras de la citotoxicidad extracelular e intracelular mediada por los macrófagos (Hibbs et ál, 1988; Liew et ál, 1990; Stamler et ál, 1992; Karupiah, 1993), incluyendo las micobacterias (Flesch et ál, 1987; Stuehr et ál, 1987; Denis, 1991; Chan et ál, 1992). La estimulación de macrófagos murinos con lipopolisacáridos e IFN- γ produce un incremento de la síntesis de NO sintetasa (Stuehr et ál, 1987). El IFN- γ y el TNF inducen este mecanismo (Drapier et ál, 1988). Esta ruta se encuentra en macrófagos de ratón estimulados con *M. tuberculosis* y *M. bovis*, y en macrófagos humanos estimulados con *M. avium* vivo.

Existe una variación en la susceptibilidad de las distintas cepas de micobacterias a la acción de los RNIs; destruyen la cepa *M. tuberculosis* Erdman (Chan et ál, 1992), pero no la cepa Middleburg (Flesch et ál, 1991).

g. Las defensinas

Los gránulos electrodensos de los macrófagos contienen pequeños péptidos antibacterianos denominados defensinas que forman canales en las membranas de los microorganismos, haciéndolas permeables. Sus condiciones óptimas de actividad son a pH básico, en un breve momento tras la fagocitosis.

h. La limitación de nutrientes

Algunos nutrientes, como las purinas y los productos aromáticos, no están disponibles para los patógenos intracelulares. Esta limitación por parte del hospedador se considera un

mecanismo de inmunidad no específica (Baümmler et ál., 1995). La disminución de triptófano en los macrófagos activados con IFN- γ tiene efecto bacteriostático (Carlin et ál, 1987). Todas las micobacterias (excepto *M. paratuberculosis*) contienen micobactinas, moléculas quelantes del hierro (Besra et ál, 1994), uno de los principales nutrientes limitados por el hospedador (Baümmler et ál, 1995).

5.2.3. Citoquinas producidas por los macrófagos

Los macrófagos que han fagocitado *M. tuberculosis* producen un patrón característico de sustancias solubles: las citoquinas y los derivados del ácido araquidónico. Estas citoquinas ejercen un potente efecto inmunoregulator y son responsables de algunos síntomas clínicos de la tuberculosis. Las principales son: interleuquina 1 (IL-1), IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, factor alfa de necrosis tumoral (*tumoral necrosis factor-alpha*, TNF- α) y factor beta de transformación del crecimiento (*transforming growth factor-beta*, TGF- β).

En los genes para IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α existe un factor de transcripción (*nuclear transcription factor*, NF-IL-6), es una ruta común para la expresión de citoquinas estimulado por *M. tuberculosis* y su lipoarabinomanano (Natsuka et ál, 1992; Zhang et ál, 1993).

a. La interleuquina 1

La interleuquina 1 (IL-1) está formada por dos polipéptidos con actividad biológica similar; la IL-1 α permanece en el citoplasma, y la IL-1 β es secretada al exterior. La IL-1 se produce en respuesta a la estimulación con *M. tuberculosis* o algunos componentes específicos (lipoarabinomanano y proteínas de 20 y 46 KDa) (Wallis et ál, 1990; Barnes et ál, 1992; Zhang et ál, 1993). Induce en los macrófagos la producción de IL-6 y TNF- α , y estimula en los linfocitos T la producción de IL-2 y la expresión de sus receptores (Platanias et ál, 1990). Las cantidades excesivas de IL-1 se asocian con una supresión en la proliferación de linfocitos y resultados negativos en la intradermoreacción. Es un pirógeno endógeno y puede contribuir a la fiebre (Dinarello, 1984).

b. La interleuquina 6

Es un potente factor de crecimiento y diferenciación de los linfocitos B (Hirano et ál, 1990). Puede ser responsable de la inmunoglobulinemia característica de algunas tuberculosis. La adición de IL-6 a los monocitos estimula el crecimiento intra y extracelular de las micobacterias (Bermúdez et ál, 1992).

c. La interleuquina 8

Es un factor quimiotáctico para neutrófilos, linfocitos T y basófilos. La producción exagerada de esta interleuquina podría originar el aumento de neutrófilos y linfocitos T en las lesiones y contribuir a la destrucción tisular (Friedland et ál, 1992).

d. La interleuquina 10

Es una linfoquina antiinflamatoria; inhibe la síntesis de citoquinas en los monocitos y linfocitos (Fiorentino et ál, 1991; Mosmann et ál, 1991; de Waal et ál, 1991), disminuye la producción de RNI, y por lo tanto la capacidad antimicobacteriana (Flesch et ál, 1994), inhibe la actividad microbicida de los macrófagos (Bogdan et ál, 1991) y suprime la proliferación de los linfocitos T específicos de antígeno al limitar la expresión del MHC de clase II en los macrófagos (de Waal et ál, 1991). Estos efectos sugieren una inhibición de la respuesta inmune, quizás contribuyendo a la anergia y a la incapacidad de los linfocitos para proliferar en respuesta a *M. tuberculosis*.

e. La interleuquina 12

La IL-12 participa, junto con la IL-2, en las primeras fases de la respuesta inmune como factor de crecimiento, favoreciendo el desarrollo de los linfocitos T precursores en Th1 (Sypek et ál, 1993) y aumentando la proliferación de las células T citotóxicas específicas de antígeno y de las NK (Gateli et ál, 1992). La IL-12 aumenta la citotoxicidad de los linfocitos CD4⁺ contra macrófagos infectados (Bloom et ál, 1992).

f. El factor α de necrosis tumoral

Los macrófagos humanos y murinos producen grandes cantidades de TNF- α en respuesta a *M. tuberculosis* (Valone et ál, 1988; Barnes et ál, 1992) o a algunos de sus

componentes (lipoarabinomano y las proteínas de 20, 44, 58 y 65 KDa) (Moreno et ál, 1989; Wallis et ál, 1990; Barnes et ál, 1992; Zhang et ál, 1993; Wallis et ál, 1993).

La adición de TNF- α a macrófagos incrementa la actividad antimicobacteriana (Bermúdez et ál, 1988; Flesch et ál, 1990). Tiene efecto sinérgico con el IFN- γ para incrementar la producción del óxido nítrico en los macrófagos de ratón (Ding et ál, 1988; Drapier, 1988), y de ROI (Zimmerman et ál, 1989). Asimismo, es esencial para la formación de los granulomas que controlan la infección por las micobacterias, incluyendo *M. bovis* BCG (Kindler et ál, 1989) y en el mantenimiento de estos granulomas (Adams et ál, 1995). El TNF- α liberado por los macrófagos de un granuloma en desarrollo estimula la producción de más TNF- α , contribuyendo a la eliminación de las micobacterias. El bloqueo de este factor exacerba la infección (Adams et ál, 1995).

Existe una correlación inversa entre la virulencia de la cepa y la inducción de secreción de TNF- α en macrófagos murinos, relacionada con el contenido en lipoarabinomano. La cepa virulenta *M. tuberculosis* Erdman induce una menor producción de TNF- α que la cepa H37Ra (Chatterjee et ál, 1992; Roach et ál, 1993; Zhang et ál, 1993; Falcone et ál, 1994).

La excesiva producción local de TNF- α causa los efectos inmunopatológicos característicos de la tuberculosis, como fiebre, pérdida de peso y la marcada necrosis tisular característica de la tuberculosis avanzada (Beutler et ál, 1987).

g. El factor beta de transformación del crecimiento

El TGF- β inhibe en los macrófagos la síntesis de citoquinas y disminuye la expresión del MHC de clase II (Esenik et ál, 1987; Czarniecki et ál, 1988), así como la expresión del receptor de IL-2 (Kehrl et ál, 1986). Suprime la proliferación de las células T e inhibe la función efectora de los macrófagos (Tsunawaki et ál, 1988). La IL-10 y el TGF- β pueden evitar la inflamación excesiva y el daño tisular de la respuesta inflamatoria incontrolada.

5.2.4. Reconocimiento del antígeno por los linfocitos T

Las células T reconocen el antígeno con un receptor compuesto por las cadenas polipeptídicas α y β , o γ y δ . Cuando el antígeno se ha unido, la señal de transducción al citoplasma desencadena la producción de citoquinas y la actividad citolítica. La mayoría de las células $\alpha\beta$ tienen los determinantes CD4 o CD8. Las células CD4⁺ reconocen los antígenos (residentes en el compartimento endosomal) asociados a las glicoproteínas del MHC de clase II (Kaufmann, 1990); mientras que las CD8⁺ reconocen el antígeno en el contexto de los productos del MHC de clase I (Playfair, 1987). Las moléculas de restricción para los linfocitos T $\gamma\delta$ no están definidas (Strominger, 1989).

5.2.5. Antígenos de las micobacterias reconocidos por los linfocitos T

Las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* contienen una amplia variedad de antígenos que pueden ser clasificados en antígenos estructurales, presentes en el citoplasma o en la pared, y antígenos de secreción. Algunas proteínas de secreción y los filtrados de cultivo inducen la producción de TNF en los monocitos (Aung et ál, 1993). Los antígenos de las micobacterias, incluyendo *M. bovis*, han sido caracterizados con la finalidad de obtener reactivos específicos y bien definidos para su uso diagnóstico y la producción de vacunas (Fifis et ál, 1994). Los lípidos y los carbohidratos (arabinomanano y arabinogalactano) presentan más reacciones cruzadas con otras micobacterias (Rirnbaun et ál, 1969; Azuma et ál, 1970; Misaki et ál, 1974; Daniel et ál, 1978), corinebacterias y nocardias (Cummins, 1962); por lo que no son antígenos específicos y tienen un significado limitado en un diagnóstico serológico (Krambovitis, 1987).

La mayoría de los antígenos de *M. bovis* caracterizados hasta la fecha son proteínas solubles presentes en extractos celulares o liberadas al medio de cultivo tras la destrucción de las células. Se considera que las proteínas son antígenos específicos y que esta especificidad está asociada a proteínas de bajo peso molecular, estables al calor y de alta movilidad electroforética (Krambovitis, 1987). Los antígenos proteicos de las micobacterias también presentan reacciones cruzadas (Harboe et ál, 1979; Closs et ál, 1980). La mayor parte

de los monoclonales reaccionan con un gran número de especies de micobacterias, y en algunos casos con otras especies bacterianas (Engers et ál, 1986). La principal característica es que la especificidad existe a nivel de epítipo (Buchanan et al., 1987). Gran parte de los antígenos de los microorganismos del complejo *M. tuberculosis* son idénticos o de estructura muy similar (Coates et al., 1981). Casi todos los anticuerpos monoclonales preparados frente a *M. tuberculosis* reaccionan también con los antígenos de *M. bovis*, y solamente un anticuerpo monoclonal es específico de *M. tuberculosis* (Ljungqvist et ál, 1988). Existen anticuerpos monoclonales específicos frente a tres diferentes epítipos de la proteína MPB70, específica de *M. bovis* (Wood et ál, 1988).

Los estudios en seres humanos y en ratones han demostrado que la respuesta inmune a un antígeno micobacteriano en particular depende de los individuos (Ivanyi et ál, 1986; Bothamley et ál, 1989). También en el ganado vacuno existen marcadas diferencias en la reacción de los sueros de animales infectados frente a antígenos proteicos purificados (Fifis et ál, 1992). Las respuestas de anticuerpos, o la proliferación de linfocitos frente a un antígeno en especial o frente a un epítipo, están controladas genéticamente (Young et ál, 1990; Andersen et ál, 1991) y pueden variar ampliamente entre individuos. Parece existir una preferencia de respuesta ante varios epítipos, siendo unos reconocidos con más intensidad que otros (Young et ál, 1990). En el ratón, estas diferencias en la respuesta dependen de las líneas familiares (Andersen et ál, 1991). Las respuestas celular y humoral respecto a un antígeno cambian durante el curso de la infección; produciendo los diferentes estadios de infección patrones de anticuerpos específicos. Con algunos antígenos (MPB70) este cambio es especialmente marcado; en algunos animales infectados la respuesta celular cambia de muy fuerte a casi indetectable, y al mismo tiempo, la repuesta de anticuerpos aumenta sustancialmente (Fifis et ál, 1994).

No todos los animales infectados responden de la misma forma a la estimulación con antígenos in vitro en los mismos periodos de tiempo, probablemente porque existe una variación genética en el establecimiento de la enfermedad (Fifis et ál, 1994). Para un ensayo tanto serológico como celular en el que se quiera obtener alta sensibilidad manteniendo alta especificidad, sería necesario un antígeno que indujera respuesta durante todo el curso de la

infección, o una combinación de varios antígenos específicos de *M. bovis* que cubrieran todos los estadios (Fifis et ál, 1994; Wood et ál, 1994).

Sólamamente la inmunización con micobacterias vivas confiere inmunidad protectora frente a la tuberculosis (Mackanness, 1967; Collins, 1984; Orme, 1988). Ya que tanto los bacilos muertos como los vivos presentan antígenos estructurales similares, es probable que sean los antígenos de secreción los que confieran esta inmunidad protectora (Orme, 1988; Barnes et ál, 1994).

Los principales antígenos purificados de un cultivo celular de *M. bovis* tienen 39, 32, 30, 25, 24, 22 (a y b), 19, 15 y 12 KDa (Fifis et al., 1989). De la amplia variedad de proteínas de *M. tuberculosis*, las más importantes son los antígenos 30 y 32 KDa, 10 KDa y 65 KDa.

a. El antígeno 39 KDa

Es una proteína glicosilada, que reacciona con un anticuerpo dirigido al lipoarabinomano, de forma similar a una proteína de 38 KDa de *M. tuberculosis*. Es similar al antígeno 5 (Daniel et ál, 1979).

b. Los antígenos 30 (BCG 85B, antígeno α , MPB59 o 6) y 32 (BCG 85A o P32) KDa

Los antígenos 30 y 32 KDa, que corresponden a los antígenos BCG85 de *M. bovis* BCG (Wiker et ál, 1986), son secretados en grandes cantidades por las micobacterias en crecimiento rápido. Estas proteínas pueden unirse a la fibronectina, y se piensa que median en la adhesión del bacilo a las superficies mucosas y en la posterior invasión intracelular a través de los receptores de fibronectina de los macrófagos (Abou-Zeid et ál, 1988). El antígeno 30 KDa desencadena la proliferación de linfocitos en pacientes sanos, pero no en los pacientes con tuberculosis. El antígeno 32 KDa es estimulante de los linfocitos T, en los que desencadena una mayor proliferación de IFN- γ .

c. El antígeno 24 KDa (MPB64)

El antígeno de 24 KDa fue descrito como MPB64 en *M. bovis* BCG (Harboe et ál,

1986). En las pruebas serológicas se detectan anticuerpos frente a este antígeno en el 50% de los animales que presentan respuesta frente a los antígenos de un filtrado de cultivo (Wood et ál, 1994).

d. El antígeno 22a (MPB70, 22b, 25)

Es una proteína de 22 KDa (Nagai et ál, 1981; Harboe et ál, 1984). Las proteínas de 25 y 22 (b) KDa son formas glicosiladas. Es el principal componente de los filtrados de cultivos y de los extractos celulares, y muestra un grado considerable de heterogeneidad en cuanto a peso molecular y punto isoelectrico (Fifis et ál, 1989). Es específico de especie (Harboe et ál, 1984; Harboe et ál, 1986; Fifis et ál, 1989; Fifis et ál, 1992), excepto por una reacción cruzada con suero frente a *Nocardia asteroides* (Harboe et ál, 1984). Se ha demostrado la existencia de tres epítomos específicos de *M. bovis* en esta proteína (Wood et ál, 1988). En *M. bovis* BCG la producción de este antígeno varía según las cepas, de un 23% (Nagai et ál, 1981; Abou-Zeid et ál, 1986) a menos de un 1% en las cepas no productoras (Harboe, 1984). Estos dos grupos de cepas de *M. bovis* BCG se corresponden con diferentes patrones de ácidos micólicos (Minnikin et ál, 1984) y de polimorfismo del ADN con enzimas de restricción (Collins et ál, 1987). El gen que codifica esta proteína ha sido secuenciado (Radford et ál, 1988).

El MPB70 es un antígeno inmunodominante (Wood et ál, 1988); y uno de los componentes más inmunoreactivos de *M. bovis*, reconocido por la mayoría de los animales con una respuesta de anticuerpos detectable (Fifis et ál, 1989). El ganado vacuno infectado experimentalmente con *M. bovis* produce un patrón característico de anticuerpos anti-MPB70; presentando en el inicio un nivel bajo y constante, seguido de un marcado aumento a las 18-20 semanas post-infección (Harboe et ál, 1990). En estos animales se observa además una relación inversa entre el título de anticuerpos y las reacciones cutáneas de hipersensibilidad de tipo retardado. En las infecciones naturales la prueba de la tuberculina estimula la formación de estos anticuerpos (Harboe et ál, 1990). Las pruebas serológicas detectan anticuerpos frente a este antígeno en el 60% de los animales con respuesta humoral a un filtrado de cultivo (Wood et ál, 1994).

e. El antígeno 19 KDa

Es una glicoproteína de *M. bovis* y *M. tuberculosis*, pero que presenta reacciones cruzadas con antígenos de especies que no pertenecen al complejo *M. tuberculosis* (Ivanyi et ál, 1985; Andersen et ál, 1986).

f. El antígeno 12 KDa (10, BCG-a, MPB57, GroES)

El antígeno 12 KDa, inicialmente descrito en BCG (Minden et ál, 1984; Yamaguchi et ál, 1988), existe también en *M. tuberculosis* (Baird et ál, 1989). Está asociado con la pared celular (Abou-Zeid et ál, 1988) y origina el mayor nivel de proliferación de linfocitos y de producción de IFN- γ en reactores a la tuberculina sanos (Barnes et ál, 1992).

g. El antígeno 65 KDa (P64, GroEL)

El antígeno 65 KDa es una proteína de choque térmico, un grupo de antígenos destacados durante infecciones con varios parásitos intracelulares que fueron identificados inicialmente en respuesta a temperaturas elevadas. Son moléculas muy conservadas, con homólogas en otras bacterias y en los seres humanos; y aunque contiene un epitopo específico del complejo *M. tuberculosis*, presenta también reacciones cruzadas (Fifis et ál, 1992). En condiciones normales se encuentra en el citoplasma, pero las células generan grandes cantidades de estas proteínas en respuesta a condiciones estresantes, por ejemplo, al incrementar la temperatura de 37 a 42°C; y las posteriores modificaciones en las condiciones ambientales varían el patrón de proteínas sintetizadas (Young et ál, 1991). Se cree que también son producidas por las micobacterias en el interior de los macrófagos debido a los cambios de pH, osmolaridad, y producción de ROI y RNI. Otra proteína de estrés descrita en *M. bovis* y *M. tuberculosis* es la DnaK (70-71 KDa).

Este antígeno no es de secreción, y está presente en una alta concentración en preparaciones de micobacterias muertas que no provocan una fuerte respuesta inmune (Andersen et ál, 1991). Además, los linfocitos T de ratón que confieren inmunidad protectora contra la tuberculosis no reconocen este antígeno (Orme et ál, 1992), ni provoca la proliferación de linfocitos de reactores a la tuberculina sanos (Havlir et ál, 1991). Posiblemente existe una relación entre la síntesis de estas proteínas y la supervivencia de

patógenos en el interior del hospedador. En *S. typhimurium* y *L. pneumophila* se ha observado que un porcentaje de las proteínas de estrés inducidas por los macrófagos (*macrophage-induced stress proteins*, MIPs) se producen exclusivamente en el interior de éstos, y que no pueden ser provocadas por condiciones de cultivo estresantes (Baümle et ál, 1995). Todavía no se conoce si el mismo proceso ocurre en las micobacterias.

5.2.6. Los linfocitos T CD4⁺

La población CD4⁺ es la dominante en la defensa inmune frente a la tuberculosis mediante la producción de citoquinas y la activación de los macrófagos (Boom et ál, 1991). Los ratones que tienen estas células afectadas antes de la infección con *M. bovis* son incapaces de controlar el crecimiento de las micobacterias, mientras que la merma de las células CD8⁺ tiene efectos variables (Pedrazzini et ál, 1987; Muller et ál, 1987). En las personas, las células CD4⁺ proliferan en los focos de la infección en los pacientes con respuesta inmune resistente, así como en los casos de pleuritis (Barnes et ál, 1989). La disminución de esta subpoblación está estrechamente relacionada con la susceptibilidad a la tuberculosis primaria y con las reactivaciones en enfermos con el virus de la inmunodeficiencia humana (Barnes et ál, 1991). Las células CD4⁺ de memoria proliferan en respuesta a los antígenos de *M. tuberculosis* y producen IFN- γ para atraer y activar a los macrófagos, estimulando la actividad antimicobacteriana en sistemas experimentales (Barnes et ál, 1989).

En el ganado vacuno y en cerdos se detectan linfocitos sensibilizados 2 semanas después de una inoculación subcutánea experimental de *M. bovis* o *M. avium*; siendo la respuesta mayor a las 6 semanas (Muscoplat et ál, 1975a).

5.2.7. Citoquinas producidas por los CD4⁺

Las células CD4⁺ murinas comprenden dos subpoblaciones con funciones distintas, y que difieren en el patrón de producción de citoquinas y en los requerimientos de estimulación y presentación de antígeno (Street et ál, 1991): los linfocitos T helper tipos 1 y 2 (Th1 y

Th2). Ambas derivan de precursores comunes (Rocken et ál, 1992; Seder et ál, 1992), y las diferencias en los antígenos microbianos o en las citoquinas podrían favorecer el predominio de Th1 o de Th2 (Manetti et ál, 1993; Scott, 1993).

Las células Th1 producen IFN- γ e IL-2; incrementan la actividad microbicida de los macrófagos y aumentan la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado. Las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10; estimulan el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos B, aumentando la respuesta humoral. Las dos subpoblaciones producen IL-3 y TNF; las células T también contribuyen a la formación de granuloma. En el curso de la respuesta inmune frente a un patógeno específico, ambos tipos de células ejercen una regulación cruzada que puede favorecer el predominio de una subpoblación. Los macrófagos son las células presentadoras de antígeno óptimas para las Th1, y las células B para los Th2 (Gajewski et ál, 1991); el IFN- γ producido por las Th1 inhibe la proliferación de las Th2; la IL-1 es un importante factor de crecimiento para las Th2, pero no para las Th1 (Greenbaum et ál, 1988); y la IL-10 producida por las Th2 inhibe la síntesis de citoquinas en las Th1. Los linfocitos de ratones inmunes frente a *M. bovis* BCG producen altas concentraciones de IL-2 e IFN- γ , y bajos niveles de IL-4, sin embargo, los ratones susceptibles producen altos niveles de IL-4 y bajos niveles de IL-2 e IFN- γ (Huygen et ál, 1992).

El predominio de Th1 o de Th2 tiene efectos sorprendentes en la manifestación de la infección (Barnes et ál, 1994). La rápida expansión de la subpoblación Th1 podría estar relacionada con el control de la enfermedad y los síntomas clínicos suaves. Algunos de estos linfocitos se convierten en células de memoria e intervendrán en las reacciones de hipersensibilidad retardada. Una activación mínima de Th1 y Th2 junto con una respuesta dominada por los macrófagos, productores de sustancias mediadoras de la inflamación pero incapaces de eliminar la infección en ausencia de una respuesta de los Th1, produciría una tuberculosis progresiva (Barnes et ál, 1994). Esta enfermedad también podría estar originada por exceso de factores inmunosupresores, tales como la IL-4, IL-10 y el TGF- β producidas por los Th2 y los macrófagos. La IL-4, IL-5 e IL-6 inducen la producción de inmunoglobulinas característica de los pacientes con tuberculosis extensiva (Barnes et ál, 1994).

a. El interferón- γ

Producido por los linfocitos Th1 activados, aumenta la actividad antimicobacteriana en los macrófagos, probablemente a través del incremento de la producción de peróxido de hidrógeno y RNIs (Chan et ál, 1991; Flesch et ál, 1991). Los ratones con los genes para esta citoquina o para su receptor alterados son incapaces de controlar la infección con *M. bovis* (Dalton et ál, 1993; Kamijo et ál, 1993).

b. La interleuquina 2

Esta interleuquina es un factor de crecimiento crítico para los linfocitos T, ya que expande la población de linfocitos que reaccionan a los antígenos y probablemente aumenta la concentración local de factores secretados por los linfocitos T que activan los macrófagos (Barnes et ál, 1996).

c. La interleuquina 4

A diferencia de los efectos de las citoquinas secretadas por los Th1, la IL-4 desactiva a los macrófagos (Lehn et ál, 1989; Ho et ál, 1992), bloquea la proliferación de los linfocitos T disminuyendo la expresión de los receptores de la IL-2 (Martínez et ál, 1990) y la transcripción del gen (Schwartz et ál, 1993).

5.2.8. Actividad citolítica de las células CD4⁺

Un mecanismo alternativo con el cual los linfocitos T contribuyen a la defensa inmunitaria es la citolisis de macrófagos y otras células infectadas con *M. tuberculosis* (Boom et ál, 1991). Muchos macrófagos infectados con *M. tuberculosis* tienen escasa potencia antimicobacteriana, permitiendo a los bacilos evadir las defensas del hospedador. Las células T citolíticas que reconocen específicamente antígenos de las micobacterias pueden lisar esos macrófagos, liberando a los bacilos para que puedan ser fagocitados por macrófagos con mayor actividad antimicobacteriana (Kaufmann, 1988; Boom et ál, 1991). La actividad citolítica depende de la proporción entre macrófagos infectados y células T. Cuando la relación entre ambas poblaciones es 1:1 o menor, o la carga infectiva es baja, los macrófagos son eficientes células presentadoras de antígeno para las linfocitos T CD4⁺, que pueden

activarse y proliferar; cuando la proporción de macrófagos es superior, o la carga microbiana es muy alta, la citotoxicidad inducida por los CD4⁺ activados es mayor, ocasionando la lisis de los macrófagos (Boom et ál, 1991).

Otra posible explicación del efecto citolítico de las células T sería la limpieza, lisando macrófagos muertos que contengan un gran número de bacilos muertos, para que puedan ser catabolizados por otras células (Orme et ál, 1992). La destrucción de los macrófagos infectados libera productos tóxicos que pueden producir necrosis caseosa (Dannenberg, 1989; Lowrie, 1990; Dannenberg, 1991).

5.2.9. Los linfocitos CD8⁺

Los linfocitos T CD8⁺ constituyen la población de células T citotóxicas más importante en la defensa frente a varios patógenos intracelulares. A diferencia de las CD4⁺, las CD8⁺ no producen niveles altos de IL-2, sino que dependen de una fuente exógena de este factor de crecimiento (Barnes et ál, 1994). Los linfocitos CD8⁺ murinos pueden lisar directamente células infectadas con *M. tuberculosis*, y la merma en esta población incrementa la severidad de la tuberculosis en ratones (Kaufmann, 1988). Los linfocitos CD8⁺ reconocen los antígenos existentes en el citoplasma (en el aparato de Golgi y retículo endoplásmico, o libres), y que son presentados en el contexto de las moléculas del MHC de clase I (Moore et ál, 1988). Estas células lisan los macrófagos infectados que no han tenido éxito en detener el crecimiento micobacteriano (Saliers et ál, 1994). Probablemente, las CD4⁺ y las CD8⁺ murinas son complementarias en las respuesta inmune frente a *M. tuberculosis* (Barnes et ál, 1994).

5.2.10. Los linfocitos T $\gamma\delta$

Las células $\gamma\delta$ intervienen en las primeras fases de la respuesta inmune inicial, antes de que se haya establecido la respuesta de los linfocitos T $\alpha\beta$ (Barnes et ál, 1994). Producen TNF, IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10 (Follows et ál, 1992; Barnes et ál, 1993), atrayendo una segunda oleada de células T $\alpha\beta$, y son capaces de lisar células diana infectadas con *M.*

tuberculosis (Munk et ál, 1990; Follows et ál, 1992). El porcentaje de células $\gamma\delta$ es más elevado en los ganglios linfáticos y en los pulmones de ratones después de una infección primaria con *M. tuberculosis* (Augustin et ál, 1989; Janis et ál, 1989). También los $\gamma\delta$ humanos tienen una capacidad innata para reconocer los antígenos micobacterianos (O'Brien et ál, 1989). Un posterior reinfección con *M. tuberculosis* no incrementa el número de esta población, por lo que no es probable que intervengan en la respuesta anamnésica (Janis et ál, 1989).

La expansión de estas células es mayor en individuos sanos que reaccionan a la prueba de la tuberculina y en pacientes con pleuritis que en aquellos con tuberculosis pulmonar avanzada o miliar, sugiriendo que las células T $\gamma\delta$ contribuyen en la resistencia inmune (Barnes et ál, 1992).

5.2.11. Citoquinas: protección e inmunopatología

La necrosis tisular y la fibrosis características de la tuberculosis son, en parte, manifestaciones de la actividad de las linfoquinas producidas durante la respuesta inflamatoria. Los macrófagos alveolares que inicialmente fagocitan las micobacterias producen IL-1, IL-8 e IFN- γ , moléculas proinflamatorias que atraer más linfocitos y monocitos. También producen TNF- α , que activa los macrófagos y aumenta la actividad micobactericida, y 1,25-dihidroxitamina D (Barnes et ál, 1989). El IFN- γ y la 1,25-dihidroxitamina D incrementan la activación de los macrófagos. Esta respuesta inmunitaria protectora puede causar necrosis tisular, así como los efectos sistémicos, fiebre y pérdida de peso, al pasar el TNF- α a la circulación.

La IL-10 y el TGF- β producidos por los macrófagos (Toossi et ál, 1991; Barnes et ál, 1993) son inmunosupresoras y pueden limitar la extensión del daño tisular. Una producción excesiva de estas citoquinas puede provocar un fallo del control de la infección.

La anergia de algunos pacientes humanos tuberculosos, negativos al test de la tuberculina, está asociada a un fallo en la proliferación de los linfocitos T en respuesta a los

antígenos de *M. tuberculosis*. Está producida por una exagerada expresión de factores de supresión (específicos de antígeno) elaborados por los monocitos de estos pacientes. La producción de grandes cantidades de IL-1 puede provocar el consumo de IL-2, un factor de crecimiento crítico. Las células gigantes de Langhans y las células epitelioides expresan ARNm de TGF- β (Toosi et ál, 1991), sugiriendo que la producción de esta citoquina puede provocar la desactivación de los macrófagos.

5.2.12. El espectro de la respuesta inmune

El espectro de la respuesta inmune fue inicialmente descrito en la lepra y en la tuberculosis (Ridley et ál, 1966; Lenzini, 1977). Las cargas bacilares bajas originan una buena respuesta de la CMI, con escasa o nula producción de anticuerpos. Los individuos con una CMI limitada tienen títulos de anticuerpos altos y fuertes cargas bacilares. Entre ambos extremos existe un gran intervalo de situaciones intermedias. En las infecciones por micobacterias en las personas, los altos niveles de anticuerpos circulantes están a menudo correlacionados con un fallo en la respuesta del sistema inmunológico para contener el crecimiento de las bacterias y la progresión de la enfermedad (Lenzini et ál, 1977).

Estas variaciones en la respuesta inmune ocurren también en el ganado tuberculoso (Lepper et ál, 1977; Hanna et ál, 1989, Hanna et ál, 1992). La correlación directa entre el título de anticuerpos y la severidad de la infección ha sido demostrada también en las vacas (Wallace et ál, 1968; Lepper et ál, 1973). Las respuestas con anticuerpos son evidentes en las infecciones experimentales agudas, y la demora antes de que los títulos de anticuerpos puedan ser detectados aumenta conforme disminuye la dosis, relacionándose también con una reducción en el número de las lesiones. Varios estudios serológicos demuestran la relación recíproca entre la capacidad de reacción de las células T y la infección localizada, frente a los niveles de anticuerpos y la enfermedad progresiva (Plackett et ál, 1989; Harboe et ál, 1990; Ritacco et ál, 1990). Cuando la inmunidad mediada por células predomina, el hospedador está respondiendo activamente frente al patógeno, limitando su diseminación a otros tejidos (Ralph, 1989). Esta limitada respuesta humoral es la principal limitación en el desarrollo de las pruebas serológicas (Wood et ál, 1994). La relación inversa entre la

inmunidad mediada por células y la respuesta humoral ha sido también confirmada en ganado naturalmente infectado; las lesiones localizadas parecen estar asociadas con una producción elevada de interferón- γ y bajos títulos de anticuerpos, y las lesiones tuberculosas diseminadas se encuentran en animales con altos niveles de anticuerpos y una producción baja o inexistente de interferón (Ritacco et ál, 1991).

En el ganado vacuno, como en las personas, la mayoría de los individuos son capaces de organizar una respuesta de células T efectiva para contener la infección, con focos localizados durante largos periodos de tiempo. Sin embargo otras especies, como el tejón y el possum, desarrollan una enfermedad progresiva rápida (Thorns et ál, 1983).

5.2.13. La hipersensibilidad de tipo retardado

El derivado de proteína purificada estimula los linfocitos T CD4⁺ de memoria (sensibilizados) de los animales previamente expuestos (Platt et ál, 1983); éstos proliferan en respuesta a los antígenos de las micobacterias y secretan citoquinas, principalmente del tipo Th1 (Tsicopoulos et ál, 1992), que atraen neutrófilos, macrófagos y monocitos al punto de inoculación. El efecto local de las citoquinas junto con la pérdida de líquido producida por la migración de los fagocitos a través de los vasos sanguíneos produce el eritema, y los depósitos de fibrina causan la induración. Las altas concentraciones de citoquinas, las sustancias liberadas en la desintegración de los macrófagos, la isquemia y la activación local del complemento por complejos inmunes son los factores que producen la necrosis (Dannenberg, 1989). El tipo de respuesta inmune generada en la intradermorreacción, la hipersensibilidad de tipo retardado (*delayed-type hypersensitivity*, DTH), se solapa pero no es exactamente lo mismo, que la inmunidad mediada por células desencadenada por el crecimiento de las micobacterias en el pulmón (Saliers et ál, 1994).

La sensibilización persiste indefinidamente aunque la infección que la haya provocado esté localizada o eliminada por completo, a excepción de la anergia en los casos de diseminación muy rápida de la infección, y la desensibilización temporal tras la intradermotuberculinización y en el postparto. En el ganado infectado experimentalmente

existe una relación inversa entre el título de anticuerpos y la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (Harboe et ál, 1990).

5.3. FACTORES DE VIRULENCIA: EFECTOS DE LOS CONSTITUYENTES DE LAS MICOBACTERIAS EN LA FUNCIÓN DE LOS MACRÓFAGOS

Algunos de los constituyentes de los microorganismos del complejo *M. tuberculosis* pueden ser capaces de alterar la función de los macrófagos, reduciendo su capacidad efectora, desarrollando estrategias a diferentes niveles: (1) modificación de la fagocitosis, (2) inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma, (3) evitación o neutralización de la acidificación del fagosoma, (4) resistencia al contenido lisosomal, (5) tolerancia de la producción de ROI y RNI, (6) modificación de la secreción de citoquinas (principalmente TNF- α), y (7) activación a un estado micobactericida incrementado (McDonough et ál, 1993; García-del Portillo et ál, 1995; Krahenbuhl, 1995). Los factores de virulencia de las micobacterias que actúan a nivel de los macrófagos inducen cambios que favorecen la supervivencia intracelular del patógeno, alterando la capacidad microbicida de los macrófagos o su colaboración con el resto del sistema inmune en la CMI.

Las micobacterias no producen ni exotoxinas ni endotoxinas, a pesar de lo cual producen extensas lesiones tisulares. Su envoltura celular contiene una alta proporción de lípidos, responsables de la hidrofobicidad, de su lento crecimiento, y de la resistencia a los ácidos y a los desinfectantes. Han sido aislados, caracterizados y evaluados para determinar su importancia en la patogenicidad.

Varios de los componentes de la pared celular de las micobacterias están implicados en la respuesta del hospedador a *M. tuberculosis* y otras micobacteriosis (Goren et ál, 1979). Los componentes lipídicos de la pared de las micobacterias estimulan la respuesta basada en anticuerpos frente antígenos proteicos, formando parte del adjuvante de Freund. Los componentes de la pared de las micobacterias (carbohidratos y glicolípidos), así como las proteínas secretadas, pueden desencadenar los efectos inmunosupresores de los macrófagos en los pacientes tuberculosos.

La segunda fracción química importante en las micobacterias son las tuberculoproteínas. Son capaces de provocar un estado de hipersensibilización con la que los macrófagos adquieren la capacidad de matar células infectadas, origen de la tendencia a la necrosis caseosa central (Jubb et ál, 1980).

5.3.1. Los sulfátidos

Son compuestos del disacárido trehalosa esterificado con un grupo sulfato y cuatro ácidos grasos, tres de ellos de cadena larga y con grupos metilo (Goren et ál, 1976). Forma parte de los componentes exteriores de la membrana. El principal sulfátido de *M. tuberculosis* es el SL-I.

Las cepas atenuadas apenas contiene sulfátidos, mientras que las cepas virulentas producen grandes cantidades de estas sustancias (Goren et ál, 1982). Los sulfátidos de *M. tuberculosis* son inhibidores de los macrófagos, bloquean el aumento de la actividad en los monocitos humanos estimulados con IFN- γ , lipopolisacáridos e IL-1 β , inhibiendo la activación del fagosoma (Goren, 1987), alterando la producción de superóxido y la fagocitosis (Pabst et ál, 1988; Brozna et ál, 1991), y potenciando los efectos tóxicos del cord factor en las mitocondrias (Kato et ál, 1974).

Sin embargo, la mayoría de las especies de micobacterias producen sulfátidos, incluyendo aquellas no asociadas con enfermedad y que son fácilmente destruidas en el interior de los macrófagos. Los sulfátidos de *M. tuberculosis* pueden inhibir la formación del fagolisosoma (Goren et ál, 1976), pero probablemente no contribuyan sobremanera a su supervivencia intracelular (Riley, 1996).

5.3.2. El cord factor

El cord factor (Bloch, 1950) es el responsable del crecimiento formando agregados, con aspecto de cuerda o serpentina, de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* (Middlebrook et ál, 1947). Fué identificado como el 6,6' dimicolato de trehalosa (TDM) (Noll

et ál, 1956).

La cepa *M. tuberculosis* H37Rv posee una alta concentración de esta sustancia, mientras que la cepa H37Ra contiene muy poco (Bloch, 1950). Los macrófagos peritoneales producen una notable cantidad de TNF- α al ser estimulados con el TDM (Silva et ál, 1988; Matsunaga et ál, 1990). La eliminación de este factor en *M. tuberculosis* disminuye la capacidad del microorganismo para causar enfermedad progresiva en el ratón, y disminuye también la capacidad de *M. bovis* BCG para persistir en el pulmón (Silva et ál, 1985). Sin embargo, se pueden encontrar grandes cantidades de esta sustancia en otras micobacterias no consideradas virulentas (Goren et ál, 1979).

Otras actividades biológicas del cord factor incluyen toxicidad (Kato, 1973), inhibición de la fusión inducida por el Ca^{2+} de vesículas fosfolípídicas (Spargo et ál, 1991), e inhibición de la migración de los leucocitos (Goren et ál, 1979). En las células hepáticas induce la rotura de las mitocondrias, y la desintegración del retículo endoplásmico rugoso y de los ribosomas (Thoen et ál, 1986).

5.3.3. El lipoarabinomanano

El lipoarabinomanano (LAM) es el miembro más antigénico de la familia de lipopolisacáridos (LPS) fosforilados de las paredes celulares de *M. tuberculosis*, *M. leprae* y otras micobacterias (Hunter et ál, 1990). Inicialmente identificado como un antígeno de 35 KDa, está relacionado con otros LPS de las micobacterias: el lipomanano y el fosfatidilinositol manósido (Brennan et ál, 1967). Se localiza también en la superficie exterior de la membrana de la micobacteria, anclado con un grupo fosfatidilinositol (Hunter et ál, 1990). Parece contener residuos de arabinosa inmunodominantes extendiéndose desde el núcleo central de manosas.

El LAM es un potente inmunosupresor de diversas funciones relacionadas con la CMI; el LAM intacto inhibe la activación de los macrófagos murinos y humanos mediada por el IFN- γ , afectando a la transducción de la señal (Sibley et ál, 1988; Chan et ál, 1991;

Krahenbuhl, 1995). Es además capaz de eliminar los ROI potencialmente citotóxicos (Chan et ál, 1991). El LAM afecta a la presentación de los antígenos en los macrófagos, bloqueando la regulación de las moléculas del MHC de clase II (Sibley et ál, 1988). Inhibe la respuesta a los antígenos en los linfocitos humanos (Kaplan et ál, 1987), y la proliferación de los clones de las células T CD4⁺ (Moreno et ál, 1988).

La supervivencia intracelular de ciertas micobacterias puede deberse a una relación entre la estructura y la función de esta molécula. El núcleo central de fosfatidilinositol y manosa está conservado en las diferentes micobacterias, pero en los extremos de las moléculas, presentados en la superficie de los microorganismos, si existen algunas diferencias (Chatterjee et ál, 1992a). El LAM de la cepa *M. tuberculosis* Erdman está protegidos con manosa (ManLAM) (Chatterjee et ál, 1992b). En contraste, el LAM de las micobacterias de crecimiento rápido avirulentas carece de estos grupos en las cadenas laterales de arabinosa (AraLAM).

El LAM puede ser importante en la fagocitosis de las micobacterias mediada por receptores de manosa (Schlesinger, 1993), ya que las terminaciones de manosa del ManLAM funcionan como ligandos de estos receptores de los macrófagos (Schlesinger et ál, 1994). Además, el LAM de cepas virulentas de *M. tuberculosis* no provoca la producción de grandes cantidades de TNF- α ; el ManLAM de la cepa Erdman no estimula la producción de TNF- α en los macrófagos del ratón, mientras que la AraLAM de cepas avirulenta si tiene esa capacidad (Chatterjee et ál, 1992b; Barnes et ál, 1992; Adams et ál, 1993; Roach et ál, 1993). Esta relación sugiere que el lipoarabinomanano podría facilitar el crecimiento intracelular de las cepas virulentas al reducir la producción de TNF- α , y por lo tanto, evitando su acción micobactericida.

Sin embargo, existen dos contradicciones en la hipótesis de la relación ManLAM-TNF- α ; el LAM aislado de la cepa H37Rv induce la producción de TNF- α (Moreno et ál, 1989), aunque no se conoce si la estructura del LAM de esta cepa es ManLAM; y el LAM de *M. bovis* BCG, una cepa de virulencia atenuada, es del tipo ManLAM (Prinzis et ál, 1993).

5.3.4. Las ceras

Son productos formados por la esterificación del ácido micocerósico y de phthiocerol (Noll, 1957). Las ceras A, B, C y D se aislaron de diferentes especies de micobacterias (Anderson, 1941). La cera D es un producto autolítico del mAGP de la pared celular (Goren et ál, 1979), tiene actividad como adyuvante, activa los macrófagos, estimula la CMI e induce la formación de granulomas (Biberstein et ál, 1990).

5.4. FORMACIÓN DE LAS LESIONES

La lesión primaria se establece tras la interacción entre el patógeno y el hospedador. Una única partícula de aerosol (de menos de 5 μm), conteniendo de 1 a 3 bacilos puede ser suficiente para iniciar el desarrollo de la lesión primaria (O'Grady et ál, 1963). El microorganismo alcanza los alveolos pulmonares, donde es ingerido por un macrófago alveolar en cuyo citoplasma se multiplica lentamente (Dannenberg, 1982; Thoen et ál, 1986; Timonei et ál, 1988). En la primera exposición al microorganismo, la resistencia a la destrucción tras la fagocitosis permite la multiplicación intra y extracelular (Biberstein et ál, 1990; Quinn et ál, 1994). Una inflamación granulomatosa similar se inicia también por hongos, parásitos y partículas inertes como asbestos y sílica, componentes que los lisosomas de los macrófagos no pueden degradar. El macrófago muere, y los bacilos liberados son ingeridos por otros. Los monocitos sanguíneos son también atraídos al punto de infección (Kaufmann, 1990) e ingieren, pero no eliminan, al agente etiológico. Más monocitos sanguíneos acuden a la lesión, se transforman en macrófagos y refagocitan los restos (Cheville, 1988). También los polimorfonucleares neutrófilos son atraídos a las lesiones en el vacuno (Pritchard, 1988). Según continúa este proceso, la lesión aumenta.

Los tubérculos comienzan como pequeños agregados de macrófagos y neutrófilos (Cheville, 1988), y son visibles a los 8 días (Blood et ál, 1989). Los microorganismos escapan y las células del hospedador infectadas que alcanzan los ganglios linfáticos continúan una proliferación similar (Timonei et ál, 1988; Biberstein et ál, 1990). Esta lesión primaria, junto con la lesión en el ganglio linfático regional, se denomina complejo primario de Ranke o de

Ghon-Ranke (Blood et ál, 1989; Biberstein et ál, 1990). Siempre está presente en la primoinfección en los animales, aunque no siempre se puede demostrar claramente (Jubb et ál, 1980).

La apariencia de los macrófagos se modifica al acumular el agente causal y los restos del tejido, transformándose en las células epitelioides (Cheville, 1988). Éstas tienen un gran núcleo vesicular ovalado y citoplasma pálido. Contienen bacilos en su interior, probablemente debido a que han sobrevivido a la transformación de las células, ya que parece que estas células son incapaces de fagocitar (Jubb et al., 1980; Biberstein et al., 1990). La fusión de los macrófagos, o la división amitótica de núcleos sin división del citoplasma (Jubb et ál, 1980; Timonei et ál, 1988), forma las células gigantes o de Langhans, de citoplasma también pálido y varios núcleos en forma de herradura en el borde citoplasmático (Thoen et ál, 1986). El estímulo de la fusión y de estas transformaciones son las citoquinas liberadas por los linfocitos que migran a los granulomas (Cheville, 1988) y los lípidos (Jubb et ál, 1980).

Aunque las bacterias no son destruídas, el granuloma es un medio efectivo de localizar la infección y permitir el desarrollo de otros mecanismos inmunológicos e inflamatorios para destruir el bacilo (Thoen et ál, 1986; Cheville, 1988).

Después de la primera a cuarta semana, la respuesta inmune se modifica por el establecimiento de la inmunidad mediada por células, de una reacción por cuerpo extraño a la formación de un granuloma específico (Biberstain et ál, 1990). Los macrófagos activados, con un mayor número de fagosomas, lisosomas y mitocondrias, adquieren la capacidad de destruir las bacterias (Thoen et ál, 1986; Cheville, 1988; Quinn et ál, 1994). La activación de los macrófagos es por medio de las linfoquinas liberadas por los linfocitos T, también responsables de la necrosis caseosa (Timonei et ál, 1988), debida a la liberación de enzimas lisosomales y factor de necrosis tisular (Saliers et ál, 1994).

A medida que los granulomas se expanden por la llegada de monocitos inmunes se hacen más complejos. Estas células fagocitan macrófagos muertos y bacterias viables, y son a su vez destruídos. En algunas lesiones las células plasmáticas son habituales, indicando un

papel, aunque inefectivo, de estas células (Cheville, 1988). El centro de los tubérculos jóvenes está formado por una mezcla de células epitelioides y gigantes, rodeado de una zona de linfocitos, células plasmáticas y monocitos. En la periferia de la lesión aparecen fibroblastos para desarrollar una cápsula fibrosa periférica que finalmente rodea la lesión. Conforme la lesión progresa, la zona central se necrosa por efecto de la reacción de hipersensibilidad (Dungworth, 1985). La apariencia de estas lesiones es la de nódulos blancos o amarillentos, de consistencia firme.

Una vez establecida la CMI la infección sigue un curso diferente. Los linfocitos T específicos y los macrófagos activados previenen la diseminación. Su actuación, sin embargo, causa una extensa destrucción tisular característica de las tuberculosis progresivas. Aunque la diseminación linfática está limitada, la propagación de la infección ocurre por expansión en las zonas contiguas o a través de la erosión de los bronquios o de vasos sanguíneos (Biberstain et ál, 1990; Quinn et ál, 1994). La licuefacción y la formación de cavernas se debe a la acción enzimática en las proteínas y los lípidos (Thoen et ál, 1986). El proceso de licuefacción permite a los bacilos, presentes solo en un pequeño número en la masa caseosa, multiplicarse hasta alcanzar cantidades vertiginosas. Esta lesión es mucho más contagiosa que el estado de necrosis caseosa (Saliers et ál, 1994). La calcificación es característica de algunas especies animales, y en otras se observa rara vez y cuando ocurre suele ser en lesiones situadas en el tejido linfocitario (Jubb et ál, 1980).

Esta inmunidad, aunque protectora, no consigue eliminar todos los microorganismos de los tejidos. Algunas lesiones, rodeadas de tejido conectivo bien organizado, pueden contener bacilos viables durante años por lo que es posible la reactivación de la infección (Thoen et ál, 1986).

6. TUBERCULOSIS, UNA ENFERMEDAD EMERGENTE

Pocas de las plagas que han afligido a los hombres han causado tanto temor y sufrimiento como la tuberculosis y la lepra, ambas causadas por especies pertenecientes al género *Mycobacterium* (Grange, 1989). La tuberculosis humana, conocida como "el capitán de todos los señores de la muerte", es una de las enfermedades infecciosas más antiguas, siendo el microorganismo responsable el *Mycobacterium tuberculosis* y más raramente *M. bovis*.

Las enfermedades infecciosas no sólo no han sido erradicadas, sino que continúan siendo la mayor causa de mortalidad a nivel mundial (López, 1992), destacando por sus connotaciones sociales y económicas la tuberculosis (Murray et ál, 1992). A nivel mundial, *M. tuberculosis* y *M. bovis* son responsables de más mortalidad y morbilidad que cualquier otra bacteria patógena, y de acuerdo con las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente 1.700 millones de personas, un tercio de la población mundial, está infectada con *M. tuberculosis* (Kochi, 1991), y por lo tanto puede desarrollar la enfermedad (Kaufmann et ál, 1993).

Se estima que actualmente esta enfermedad produce 8 millones de nuevos casos y 2,9 millones de muertos cada año (Kochi, 1991). En términos globales, puede afirmarse que la tuberculosis es la causa del 6,7% de todas las muertes en países en vías de desarrollo, del 18,5% de las muertes producidas en adultos de 15 a 19 años, y del 26% de muertes evitables en adultos (Murray et ál, 1992).

En los últimos años, y a pesar de que en los países en vías de desarrollo la tuberculosis continuaba siendo un serio problema, en los países industrializados se la consideró un problema menor. Con anterioridad a los tratamientos con quimioterapia, en estos países la tasa anual de infección decrecía entre un 5 y un 6% anual debido a las transformaciones sociales y económicas. Desde 1950, con el amplio uso de ésta, se produjo un descenso anual de un 10%. Sin embargo, en los últimos años esta incidencia descendente se ha invertido, afectando especialmente a las grandes ciudades. El número de casos activos en 1990 y 1991, comparados con las menores incidencias de la enfermedad recogidas entre

los años 1985 y 1988, se ha incrementado en los países de la U.E. y en E.E.U.U., oscilando de un 33% en Suiza a un 4% en Reino Unido (30% en Dinamarca, 20% en Noruega, 5% en Suecia, etc...).

Seis factores podrían explicar la reversión de la tendencia a la disminución que desde hace casi un siglo tenía el riesgo anual de infección de la tuberculosis: (1) la epidemia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), (2) el incremento de población con miséras condiciones de vida, (3) el aumento en el número de drogadictos por vía intravenosa, (4) la concentración de estos factores de riesgo en los mismos grupos específicos de individuos, en los que hay un incremento en la transmisión, (5) inmigrantes y (6) la incapacidad de los gobiernos para mantener y mejorar los programas de tratamiento de la tuberculosis (Bloom et ál, 1992; Fox, 1992). El incremento en la transmisión activa es un indicador de un fallo en el programa de control para detectar e instaurar rápidamente una terapia efectiva en el tratamiento de los casos infecciosos de tuberculosis. Este mayor número de fuentes de infección puede afectar a la población general.

La transmisión de la infección es especialmente importante en algunos grupos de riesgo: vagabundos que viven en refugios (Nolan et ál, 1991), reclusos y personal de prisiones (Braun et ál, 1989), y personal sanitario (Greenberg et ál, 1991). En drogadictos por vía intravenosa inicialmente negativos a la prueba con PPD, el riesgo de infección es aproximadamente el 6,7%, considerablemente mayor que en el más pobre de los países en vías de desarrollo. Varios autores han atribuido una importante proporción de los brotes de tuberculosis a inmigrantes provenientes de países con alta prevalencia de esta enfermedad (Sankalé, 1983; Rieder et ál, 1989; Kaufmann et ál, 1993).

Cerca de la mitad del incremento en el número de casos de la tuberculosis es inevitable, consecuencia de la coinfección con VIH y tuberculosis; sin embargo, muchos de los casos producidos por un aumento en la transmisión activa podrían haber sido evitados por medio de programas de tratamiento efectivo. Predecir el curso del resurgimiento de esta enfermedad es difícil, puesto que continúa el riesgo de la transmisión entre los grupos de riesgo, y entre éstos y la población general. Respecto a las actuaciones a nivel mundial, la

Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Pulmonares (IUATLD) ha establecido programas de control que detectan aproximadamente dos tercios de todos los casos, tratando 65.000 personas con tasas de curación que oscilan entre el 80 y 85% en siete países en vías de desarrollo. La OMS ha iniciado recientemente un nuevo programa para proporcionar los conocimientos técnicos solicitados por los países en vías de desarrollo y elaborar un plan de investigación internacional.

6.1. EPIDEMIOLOGÍA

Para el estudio de la epidemiología de la tuberculosis se tienen en cuenta diversas variables: la incidencia, la prevalencia y la tasa anual de infección. La incidencia, definida como el número de nuevos casos que ocurren cada año, es más significativa que la prevalencia, que es el número total de casos registrados. Sin embargo, el parámetro más útil es el cálculo de la tasa o riesgo anual de infección, que equivale a la prevalencia de la infección por edades, es decir, la posibilidad de infectarse cada año con el bacilo. Esta variable ofrece una medida de la transmisión de la tuberculosis y se obtiene sometiendo a la prueba de la tuberculina a escolares y adultos jóvenes (reemplazos militares) que no hayan recibido la BCG. Existe una relación bastante constante entre el riesgo anual de infección y la incidencia de casos infecciosos de tuberculosis (Styblo, 1980), estimándose que para un riesgo anual de infección de un 1% existen de 50 a 60 casos infecciosos por cada 100.000 habitantes.

Tabla I.6. Riesgos anuales de infección estimados, nuevos casos y mortalidad de la TB en países en vías de desarrollo, 1985-1990 (Murray et ál, 1992 en Boom y Murray, 1992).

Área	Riesgo anual de infección	Casos nuevos cada año	Muertes cada año
África Subsahariana	1,5 a 2,5%	1.313.000	586.000
Norte de África y Asia Occidental	0,5 a 1,5%	323.000	91.000
Asia	1,0 a 2,0%	5.102.000	1.825.000
Sudamérica	0,5 a 1,5%	536.000	111.000
América Central y Caribe	0,5 a 1,5%	185.000	80.000
Total de países en vías de desarrollo		7.280.000	2.692.000

Los datos de prevalencia e incidencia de la tuberculosis plantean muchos problemas debidos a la variación de los métodos empleados en los distintos países para detectar y notificar los nuevos casos. Los datos oficiales son poco fidedignos e incompletos, por lo que no pueden ser utilizados para evaluar la tendencia de la enfermedad (Styhlo et ál, 1981). La incidencia anual por cada 100.000 habitantes notificada fue de 59 en Europa y 57 en África, donde, sin embargo, el riesgo de infección es al menos 20 veces superior al europeo (Bulla, 1977).

Los estudios realizados en las anteriores décadas en países considerados en vías de desarrollo indicaron que el riesgo anual de infección se sitúa entre el 2 y el 5%. Asumiendo que la población total de estos países alcanza los 3.000 millones de personas y que la tasa de infección anual media es del 3%, puede decirse que aproximadamente 100 millones de individuos se infectaron cada año (Grange, 1989). El número de individuos infectados que desarrolla la enfermedad varía de país a país y según los distintos grupos étnicos. En general, entre el 5 y el 10% desarrolla la enfermedad activa en los 5 años siguientes a la infección, y de un 3 a un 5% en un periodo posterior de sus vidas (Sbarbaro, 1975). Por lo tanto, de los 100 millones de personas infectadas cada año, entre 10 y 20 millones padecerán la enfermedad, cifra que alcanzaría los 60 millones según otros autores (Kaufmann et ál, 1993). De éstos, de 2 a 3 millones fallecen cada año y se estima que hay de 4 a 5 millones de nuevos casos infecciosos cada año.

Desde el punto de vista de la evolución de la enfermedad a nivel mundial los países se dividen en dos grupos bien definidos: los países desarrollados en los que la tasa anual de infección es baja (del 0,1 al 0,3%) y en los que hasta recientemente se observaba una declinación (aproximadamente un 10% anual), y los países en vías de desarrollo, en donde se presentan el 95% de los casos, con una tasa de infección alta y estable (del 2 al 5%). Probablemente, y puesto que la población en estos países se ha duplicado, es posible, en términos absolutos, que el número de casos de tuberculosis sea mayor ahora que en cualquier otro momento de la historia de la humanidad (Grange, 1989).

6.2. ASOCIACIÓN ENTRE VIH Y TUBERCULOSIS

La evolución de la tuberculosis en individuos infectados con el VIH es completamente diferente a la del resto de la población (Barnes et ál, 1991). Se ha estimado que a nivel mundial existen 4,4 millones de personas coinfectadas con VIH y *M. tuberculosis*, de los cuales medio millón padecen tuberculosis activa (Kaufmann et ál, 1993). La sinergia entre ambos es más mortífera de lo que se suponía, ya que un individuo infectado con tuberculosis que contacte con el VIH probablemente desarrolle la enfermedad, generalmente de curso lento. Sin embargo, individuos infectados con VIH que contactan con los bacilos tuberculosos sufren una enfermedad aguda, con diseminación miliar, falleciendo en menos de 6 meses (Fox, 1992). El riesgo de desarrollar la enfermedad para individuos positivos a la prueba de la tuberculina es el 8% anual (DiPerri et ál, 1989) y presentan más comúnmente tuberculosis extrapulmonar coexistiendo con la enfermedad pulmonar. Un estudio realizado en 20 ciudades de Estados Unidos reveló que una media de 10,4% (intervalo de 0 a 61%) de los pacientes con tuberculosis eran VIH-seropositivos (Ellner et ál, 1993). En estos pacientes el diagnóstico es a menudo difícil y se logra tardíamente porque su reactividad frente al PPD puede verse afectada debido a la anergia, y el diagnóstico radiológico puede mostrar solamente unos patrones de infiltración difusos (Kramer et ál, 1990), fácilmente confundibles con neumonía por *Pneumocystis carinii* (Ellner et ál, 1993). Sin embargo, con el tratamiento adecuado la tasa de curación parece ser tan alta para los infectados con el VIH como para los seronegativos frente a este virus (Small et ál, 1991).

6.3. CEPAS MULTIRRESISTENTES

A esta nueva tendencia de la enfermedad, hay que añadir la aparición de nuevas cepas multirresistentes a los fármacos que amenazan la capacidad de controlar la enfermedad (Bloom et ál, 1992). Desde los primeros estudios se hizo evidente que la resistencia a un único antibiótico se desarrollaba rápidamente, por lo que era necesaria una combinación de antibióticos para prevenir la aparición de resistencias.

El problema en el tratamiento de cepas sensibles de *M. tuberculosis* es la perseverancia

del paciente con los largos tratamientos, ya que tras 2 a 4 semanas los síntomas debilitantes de la tuberculosis desaparecen, y sin control activo del personal sanitario la mayoría de los pacientes abandonarían el tratamiento. Tal circunstancia contribuye a prolongar las posibilidades de contagio y produce las condiciones para la selección de microorganismos resistentes. Por ejemplo, en Nueva York entre 1982 y 1984, solamente el 9,8% de los aislamientos de pacientes no tratados eran resistentes a uno o más fármacos, frente al 22,8% de aislamientos de pacientes previamente tratados y el 52% de los aislamientos de casos de recaídas (Bloom et ál, 1992).

La tasa de mortalidad producida por estos microorganismos multirresistentes (MDR TB) podría oscilar entre el 40 y 60%, y en individuos VIH positivos podría alcanzar el 80%. Ya que la isoniazida y la rifampicina son los fármacos más efectivos, la resistencia a ambas es un grave problema clínico y de salud pública. La resistencia conjunta a isoniazida y rifampicina fué el 3,1% en nuevos casos y el 6,9% en casos recurrentes, pero en un estudio en la ciudad de Nueva York, estas cifras alcanzaban el 7 y 30% respectivamente (Bloom et ál, 1992). El número de afectados en los brotes resistentes a antibióticos (hasta 70 en un mismo brote) y la rapidez con la que éstos se han propagado sugieren que nos encontramos ante un nuevo problema.

La evidencia epidemiológica de transmisión nosocomial fue corroborada por RFLP (análisis de restricción enzimática del ADN) (Daley et ál, 1992). En cada brote, más del 80% de los afectados eran VIH-seropositivos, probablemente porque los brotes habían ocurrido en centros de atención especial para estos pacientes. La mortalidad en estos casos fué muy alta, del 72 a 89%, con una rápida progresión de 4 a 16 semanas debida a la inmunodepresión combinada con un retraso en el inicio de una terapia efectiva, causado por el tiempo necesario para realizar el antibiograma correspondiente (Ellner, 1993).

6.4. EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCION POR *M. bovis* EN LOS SERES HUMANOS

La revisión de la situación en varios países demuestra una correlación entre la

existencia de ganado infectado y la tuberculosis extrapulmonar en personas (Kazwala et ál, 1992), y entre la erradicación de la tuberculosis en el ganado, la disminución de tuberculosis por *M. bovis* en los seres humanos (Price, 1939; Gervois, 1966; Schmiedel, 1968) y el porcentaje de personas reactivos a la tuberculina (Lesslie et ál, 1972).

Con la implantación de la pasteurización de la leche como medida obligatoria, y después de completar el programa de erradicación de la tuberculosis bovina en los países industrializados, la exposición de las personas a *M. bovis* se redujo (Kataria, 1969), disminuyendo la incidencia de la infección humana por *M. bovis* hasta un nivel muy bajo (Yates et ál, 1988). Pero incluso cuando la tuberculosis bovina ha sido erradicada en un país, puede pensarse que la población humana soportará indicios de infección por tuberculosis bovina durante décadas (Magnus, 1966), ya que la enfermedad puede manifestarse mucho tiempo después de la infección inicial (Grange et ál, 1994).

Sin embargo, esta incidencia puede estar subestimada debido principalmente a dos motivos: (1) fallos laboratoriales en la diferenciación de *M. tuberculosis* y *M. bovis* (Habib et ál, 1966; Rothstein, 1970; Collins et ál, 1983; Yates et ál, 1988), y (2) falta de notificación del bacilo responsable de la enfermedad (Yates et ál, 1988), por lo que la información disponible sobre la distribución y la prevalencia de la infección por *M. bovis* es escasa. La infección pulmonar por *M. bovis* es clínica, radiológica y anatomopatológicamente indistinguible de la producida por *M. tuberculosis* (Hedvall, 1942; Wilkins et ál, 1986). Aunque existen métodos para caracterizar *M. bovis in vitro* (Karlson et ál, 1970), los tests pueden presentar un grado de variabilidad, especialmente en los subcultivos (Damsker et ál, 1974) y a menudo el diagnóstico bacteriológico se limita al examen del esputo (Ritacco et ál, 1992).

La diferenciación de ambos microorganismos es importante por dos razones. Todas las cepas de *M. bovis* son naturalmente resistentes (resistencia primaria) a la pirazinamida, y en un porcentaje variable son también resistentes a otros fármacos: 9-64% al ácido paraaminosalicílico, 4,9-10% a la isoniacida, 9% a la etionamida, 6-39% resistentes a la isoniazida y al ácido paraaminosalicílico conjuntamente y 2,5-6% a la estreptomycinina (Barrie

et ál, 1966; Kataria, 1969; Wilkins et ál, 1986). Por este motivo pueden ser necesarios pequeños ajustes que incluyan un suplemento con un tercer fármaco durante los primeros meses de tratamiento (Kataria, 1969). Aunque la quimioprofilaxis con isoniazida parece ser apropiada para individuos infectados pero que no han desarrollado infección activa, no se conoce el grado de protección que la quimioprofilaxis ofrece en esta infección (Fanning et ál, 1991). Además, el hallazgo de *M. bovis* en humanos debería originar una búsqueda epidemiológica concreta (Wigle et ál, 1972; Fanning et ál, 1991).

La importancia relativa de la tuberculosis postprimaria por una infección o reinfección exógena, frente a la reactivación de una anterior infección ha sido largamente discutida (Canetti, 1972; Sutherland et ál, 1972; Stead, 1974). La posibilidad de infección a través de ganado bovino es extremadamente reducida en los países que han completado la erradicación de esta enfermedad en el ganado vacuno (Sjögren et ál, 1978). Actualmente se considera que la mayoría de los aislamientos de *M. bovis* representan la reactivación de un foco primario de infección (Barrie et ál, 1966; Wigle et ál, 1972), y debido a la alta prevalencia de la infección en poblaciones rurales (Lesslie et ál, 1972), que las personas adultas representan un reservorio de *M. bovis* que puede potencialmente reactivarse. Las infecciones primarias pueden producirse en áreas de vacuno infectado o, principalmente en niños, por exposición a casos de tuberculosis pulmonar (Collins et ál, 1981; Collins et ál, 1983), ya que los pacientes en cuyo esputo se demuestran bacilos representan un peligro de transmisión a las personas (Sjögren et ál, 1978).

La transmisión de persona a persona de *M. bovis* es un tema controvertido, aunque se han publicado casos muy probables (Vaillaud et ál, 1966; Fanning et ál, 1991) e incluso comprobado por tipificación mediante el polimorfismo de los fragmentos producidos por enzimas de restricción (*restriction fragment length polymorphism* o RFLP) del elemento IS6110 (van Soolingen et ál, 1994). Se considera que la transmisión es menos frecuente que la de *M. tuberculosis*, ya que solamente se infectan el 13% de las personas que conviven con enfermos de tuberculosis pulmonar por *M. bovis*, frente al 29% de *M. tuberculosis* en la misma situación (Schmiedel, 1968).

La transmisión de personas al ganado vacuno ha sido bien documentada en rebaños previamente libres de la infección, sin otras fuentes de infección presentes y en los que no aparecieron nuevos casos una vez terminado el contacto con las personas afectadas. Esta transmisión tuvo lugar vía aerógena o por contaminación de los establos con orina de trabajadores de granja con infección genitourinaria (Torning, 1965; Baldwin., 1968; Lesslie, 1968; Huitema, 1969).

La transmisión del ganado a los seres humanos está directamente relacionada con el grado de tuberculosis de los rebaños con los que han estado en contacto (Sigurdsson, 1945). Históricamente la principal vía de infección fue la ingestión de leche sin pasteurizar; la obligatoriedad de la pasteurización redujo marcadamente la incidencia de la tuberculosis abdominal y la escrófula en las ciudades, sin embargo tuvo poco impacto en la incidencia de la tuberculosis pulmonar en la población rural (Schmiedel, 1968). También puede transmitirse a través de aerosoles producidos por el animal enfermo o en su entorno, manejo de carcasas e infección de heridas (Roberts, 1986; Grange, 1994), es por lo tanto una infección ocupacional que afecta principalmente a veterinarios y trabajadores de mataderos y a la población rural (Barrera et al, 1987; Robinson et ál, 1988; Georghiou, 1989; Fanning et ál, 1991). De las personas infectadas, solamente el 5 o 10% no es capaz de resistir la enfermedad y desarrollará la enfermedad clínica que requiere tratamiento.

Cuando la prevalencia de la tuberculosis bovina es alta, la mayor parte de la tuberculosis humana causada por *M. bovis* es de localización extrapulmonar; linfadenopatías cervicales, lupus vulgaris y lesiones óseoarticulares (Griffith, 1937). En la primera parte de este siglo la mayor parte de los casos afectaban a niños y jóvenes (Grange et ál, 1994). Antes de la pasterización de la leche, *M. bovis* era responsable del 5-10% de todos los casos de tuberculosis en países europeos, con variaciones regionales del 3 al 80% (Schliesser et ál, 1992). Las infecciones genitourinarias eran poco comunes y afectaban a los pacientes de mayor edad. La primera infección pulmonar por *M. bovis* fue confirmada bacteriológicamente en 1909 (Griffiths, 1914). *M. bovis* producía solamente entre el 0,4-0,6% (Yates et ál, 1988) al 1-3% de todos los casos de tuberculosis pulmonar (Griffiths, 1930; Cutbill, 1944), aunque este hecho puede simplemente reflejar un alto nivel de enfermedad pulmonar por *M.*

tuberculosis en la población (O'Reilly et ál, 1995).

En el periodo comprendido entre 1959 y 1967, el 2,5% de todas las tuberculosis aisladas en Holanda fueron del tipo bovino (Huitema, 1969). Entre 1964 y 1970 representó el 0,5% de todos los casos de tuberculosis en un estudio realizado en Canadá (Wigle et ál, 1972). Entre 1969 y 1984, *M. bovis* representó el 2,8% de todos los casos de tuberculosis en Reino Unido; el 1% de tuberculosis pulmonar y el 11,4% de extrapulmonar (Wilkins et ál, 1986), siendo el pulmón el órgano más afectado. En un estudio realizado entre 1977 y 1987, casi treinta años despues de la erradicación de la tuberculosis en el ganado bovino en Reino Unido, el 1,2% de todas las tuberculosis comprobadas bacteriológicamente estaba producida por *M. bovis*; el pulmón fue el lugar de enfermedad más frecuente (40-50%), seguido de linfadenopatías en pacientes de origen indio (33%) y el tracto génitourinario en pacientes europeos (17-26%) (Yates et ál, 1988). La mayor parte de los casos ocurrieron en la población local nacida cuando todavía existían fuentes de infección bovina. En América Latina los porcentajes de tuberculosis humana producida por *M. bovis* oscilan entre el 0,4 y el 6,2% (Centrangolo et ál, 1971; Barrera et ál, 1987). Según las estimaciones de la Organización Panamericana de Salud y la Organización Mundial de la Salud (PAHO/OMS) se producen aproximadamente 7.000 nuevos casos anuales de esta enfermedad, lo que equivale a una tasa de 2/100.000 habitantes frente a 70,5/100.000 producidas por el complejo *M. tuberculosis*.

Actualmente es el pulmón el órgano más frecuentemente afectado, lo que indica que la inhalación ha sido la principal ruta de infección (Robinson et ál, 1988), o que es el lugar más frecuente de tuberculosis postprimaria, independientemente de la localización de la lesion inicial (Grange et ál, 1994). El tracto genitourinario es la localización extrapulmonar más frecuente de la enfermedad producida por *M. bovis*. La distribución anatómica de las lesiones no pulmonares debida a *M. bovis* es semejante a las producidas por *M. tuberculosis*, sugiriendo que el patrón de la enfermedad no está determinado por factores intrínsecos al microorganismo (Yates et ál, 1988), y aunque inicialmente se pensó que la frecuencia de tuberculosis extrapulmonar por *M. bovis* se debía a diferentes características en el crecimiento de *M. bovis* respecto a *M. tuberculosis* (Hinshaw, 1969) estas están probablemente más

relacionadas con la ruta de infección (Robinson et ál, 1988).

En pacientes infectados también con el VIH las infecciones de *M. bovis* progresan rápidamente a una enfermedad abierta y diseminada, ya que la reducción de la inmunidad protectora elimina los factores del hospedador que limitan la progresión de la infección por *M. bovis* (Daborn et al., 1993; Dankner, 1993; Granje et ál, 1994). En un estudio realizado en California (EE.UU), el 25% de los casos de tuberculosis por *M. bovis* se debía a enfermos con HIV (Dankner, 1993). Recientemente se ha informado de un brote nosocomial de *M. bovis* multirresistente frente a isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomycin, etionamida y rifabutina, que afectó a pacientes infectados con este virus así como a un trabajador del centro de salud (Bouvet et ál, 1993).

Desde el año 1984 a 1995 se han comunicado 58 aislamientos de *M. bovis* al Sistema de Información Microbiológica (SIM) español (Tabla I.7). El 50% de estos casos tuvo localización pulmonar, el 17% renal, 9% ganglionar y 9% digestivo. Ocho de los caso eran personas inmunodeficientes. De las 31 personas cuya edad se conoce, 16 (51,6%) son mayores de 45 años. Sólomente en un caso hay constancia de contacto con ganado.

Tabla I.7. Aislamientos de *M. bovis* notificados al Sistema de Información Microbiológica (Liébana et ál, 1996).

	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95
Aislamientos de <i>M. bovis</i>	4	4	12	1	-	4	5	5	4	3	6	10

El Sistema de Declaración Obligatoria de Brotes Epidémicos recogió la notificación de un brote de tuberculosis por *M. bovis* que afectó a 53 niños y jóvenes en la Comunidad Andaluza, con adenitis cervical aparentemente debida a un problema en una planta pasteurizadora de leche. Ha existido también un brote nosocomial de *M. bovis* multirresistente que afectó a 23 enfermos que padecían el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida en un hospital de la C.A.M.

Debido a que la tuberculosis bovina todavía no ha sido erradicada, y a la existencia

de un reservorio de la infección en la población humana, continuarán existiendo casos de tuberculosis humana producida por *M. bovis*. Por lo tanto, el riesgo para otras personas y el ganado persiste, indicando que es necesaria una continua vigilancia y control.

7. LA TUBERCULOSIS EN LOS ANIMALES

Las micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* pueden producir enfermedad en un gran número de especies animales, tanto domésticos como salvajes. Sin embargo, hasta recientemente no se ha reconocido la importancia de este abanico excepcionalmente amplio de hospedadores (Morris et ál, 1994).

La tuberculosis es una enfermedad asociada a la domesticación, ya que la tuberculosis en las poblaciones salvajes es relativamente escasa y se debe al contacto previo con ganado o seres humanos (Neill et ál, 1994). Si se compara la enfermedad en ambas poblaciones de animales, destaca el empeoramiento clínico y la alta diseminación de la infección en los colectivos mantenidos en cautividad (Biberstein et ál, 1990). Sin embargo, la infección por *M. bovis* es endémica en algunas poblaciones de animales salvajes, como el tejón (*Meles meles*) en Reino Unido, y el possum (*Trichosurus vulpecula*) y el ciervo (*Cervus elaphus*) en Nueva Zelanda.

Los animales salvajes infectados son una posible fuente de contaminación para el ganado, particularmente importante en países cuyos programas de erradicación han reducido sustancialmente la incidencia de la tuberculosis bovina pero en los que inexplicablemente todavía continúan apareciendo brotes (Dodd, 1984; Stumpff, 1982; Stuart et ál, 1988; Tessaro, 1986). En Nueva Zelanda, un análisis de restricción enzimática del ADN demostró que algunas cepas aisladas de ciervo, ganado bovino y possums de la misma localidad eran idénticas, y que por lo tanto había existido transmisión de la infección entre estas especies. La convivencia de especies altamente susceptibles a la enfermedad, como el ganado vacuno y caprino, y el mantenimiento de la infección en reservorios salvajes, aumenta la dificultad de la erradicación de la enfermedad. A pesar de ello, solamente existen estadísticas fiables de la prevalencia de la infección animal en el ganado vacuno, debido a su importante repercusión económica, y en algunos países recientemente también de cabras y ciervos .

El principal obstáculo para el reconocimiento de la infección por organismos pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* (fundamentalmente *M. bovis*) en animales considerados como hospedadores no habituales, es la falta de medios de diagnóstico

apropiados (Bush et ál, 1990; Cousins et ál, 1994). La utilización de las técnica de ELISA para la detección de anticuerpos no son siempre lo suficientemente sensibles, o detectan los últimos estadíos de la enfermedad. El hallazgo de la enfermedad en animales exóticos debe recordarnos la posibilidad de infección en especies hasta ahora no consideradas como hospedadores.

7.1. TUBERCULOSIS EN EL GANADO VACUNO

7.1.1. Prevalencia mundial de la tuberculosis en el ganado vacuno

La tuberculosis bovina produce grandes pérdidas económicas en algunos países de la Unión Europea y en países en vías de desarrollo, en particular en América del Sur, donde la ganadería es un importante producto. Los datos de la prevalencia de la infección por *M. bovis* en el ganado vacuno, y de su impacto en la salud humana, en los países en desarrollo son generalmente escasos. De los 55 países africanos, 33 tienen tuberculosis bovina, 25 con prevalencia muy baja o de forma esporádica, y 8 de ellos enzoótica. Treinta países aplican algún tipo de medida para controlar esta infección, pero únicamente 7 países controlan la infección mediante un sistema rutinario de pruebas y sacrificio obligatorio. *M. bovis* está ampliamente distribuído, afectando también a los animales salvajes. Las peculiaridades del sistema ganadero, la estrecha asociación física de las personas con sus rebaños, el incremento en la demanda de leche, consumida fresca o acidificada en el 90% de los casos, y las altas tasas de infección con el virus de la inmunodeficiencia humana pueden afectar a los aspectos zoonóticos de *M. bovis* en este continente (OMS, 1993). El 50% del ganado se encuentra en países sin ningún tipo de medidas de control; y otro 40% en países donde la infección es sólo parcialmente controlada; y aproximadamente el 90% de la población africana humana vive en países en donde no se controla, o sólo precariamente, la tuberculosis bovina (OMS, 1993). En la región asiática, éstas se utilizan en 7 de los 36 países.

De 34 países de Latinoamérica y el Caribe, 20 tienen ganado infectado, y se aplican medidas en 12 países (Cosiví, 1995). Las prevalencias por animales infectados (pruebas no realizadas en la población total) en 1989, oscilan entre muy inferiores al 1% (Uruguay,

Paraguay, Venezuela, Perú, Costa Rica, Honduras), a 1,3% en Guatemala, 2,1% en México, 2,6% en Colombia, 2,9% en Chile, 3,4% en Ecuador, 5,4% en Nicaragua y 13% en Bolivia (Kantor et ál, 1994). Las prevalencias estimadas de Argentina y Brasil son superiores al 1%. Se considera que Panamá, las islas caribeñas y Cuba están libres de la infección. Cuba, el único país de este área que ha realizado la prueba de la tuberculina a nivel nacional, y en donde la prevalencia es muy baja, ha sustituido esta prueba por la vigilancia en mataderos (Kantor et ál, 1994). De los aproximadamente 300 millones de cabezas, 220 están en países con prevalencia moderada o alta, o donde no existe información disponible. El 26,3% está localizado en países libres de tuberculosis o con programas de erradicación; el 7,1% de los animales es de países con prevalencias entre el 0,1 y el 0,9%; y el restante 66,6% de los animales con prevalencia del 1% o superior (Kantor et ál, 1994).

Tabla I.8. Prevalencia de la tuberculosis bovina y medidas de control en países en desarrollo (Cosivi, 1995).

Región (número de países)	Prevalencia de tuberculosis bovina			Control de la tuberculosis bovina: test y sacrificio	Población que vive en países donde existen estos programas de control (%)		
	Presencia	Ausencia	No existen datos		vacuno	vacas lecheras	personas
África (55)	33	4	18	7	17	14,1	18,1
Asia (36)	17	10	9	7	5,6	16,1	6,3
Latinoamérica y Caribe (34)	20	12	2	12	76,1	65,9	59,1

La prevalencia de rebaños infectados en Estados Unidos y Canadá es actualmente muy baja, 0,003% repartidos en 23 de los estados (Essey et ál, 1994). La eliminación de todos los animales de un rebaño tuberculoso es considerada uno de los elementos más importantes en el programa de erradicación de *M. bovis*. El control de la infección en los novillos mexicanos importados y en los ungulados (cérvidos y bisonte) son los principales impedimentos para la erradicación de la infección en estos países (Essey et ál, 1994).

Tras la aplicación del plan de erradicación de la tuberculosis basado en la intradermotuberculinización, necropsia detallada de los reactivos y sacrificio obligatorio de

todos los animales del rebaño afectado, todas las áreas de Australia están declaradas libres de tuberculosis desde 1992, aunque algunas zonas están en cuarentena y aún existen focos endémicos en los búfalos de agua de los territorios del norte. En Nueva Zelanda la tuberculosis está considerada endémica en algunas áreas geográficas definidas, en las que la infección se ha establecido en poblaciones de animales salvajes o asilvestrados que actúan como reservorios (possums, hurones, ciervos, cerdos y cabras salvajes). La infección afecta al 2,7% de los rebaños de ganado vacuno, y al 3,9% de los rebaños de ciervos (Tweddle et ál, 1994).

España e Irlanda son los países europeos con prevalencias más altas de esta infección (Tabla I.9).

Tabla I.9. Prevalencia de tuberculosis en rebaños en países miembros de la Comunidad Europea en 1991 (Caffrey, 1994).

País	Prevalencia en rebaños (%)
Dinamarca, Luxemburgo, Holanda	0
Bélgica	0,01
Alemania	0,024
Portugal	0,12
Reino Unido	0,15
Grecia	0,31
Francia	0,35
Italia	3,71
Irlanda	8,8
España	10,8

a. España

La autoridad central encargada de la coordinación de las Campañas de Saneamiento es la Subdirección General de Sanidad Animal, perteneciente al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Los responsables de la ejecución de las Campañas de Saneamiento Ganadero son los Servicios Veterinarios de Sanidad Animal de las Consejerías de Agricultura de las Comunidades Autónomas.

Con la entrada en vigor del Acta Única en 1993 se produjo la apertura de fronteras al resto de países comunitarios, lo que supone que aquellos productos españoles que no posean absoluta garantía sanitaria no pueden competir en los mercados europeos. Solamente los animales o sus productos procedentes de rebaños oficialmente libres de tuberculosis (*officially tuberculosis-free*, OTF) pueden ser exportados.

Los animales son correctamente identificados de acuerdo a la Orden del 28 de Febrero de 1986 y el Real Decreto 225/1994 por un sistema de crotal individual. La prueba de diagnóstico oficial es la intradermotuberculinización (orden 28 febrero 1986). La dosis de tuberculina inyectada será de 2.000 U.C.T. como mínimo en cada caso, y el volumen de la inyección no sobrepasará los 0,2 ml. La distribución de antígenos para el diagnóstico de esta enfermedad se realiza con carácter gratuito por los Servicios Oficiales, estando prohibida su comercialización y venta a particulares. A las 72 horas se procederá a la lectura de los resultados de la prueba y al marcaje de los animales positivos en la oreja con un taladro en forma de T. En el caso de aparición de animales que reaccionen positivamente se procederá, de forma obligatoria, al sacrificio de los mismos y se indemnizará al ganadero de acuerdo con los baremos oficialmente establecidos. Para ello en el momento del marcado se da al ganadero la documentación necesaria (guía o conduce) para que puedan realizar su traslado al matadero. El sacrificio de los animales no puede ser prorrogado en un plazo superior a 30 días de la fecha indicada en la documentación sanitaria salvo casos excepcionales. Si algún animal fuese objeto de decomiso total se procederá a la destrucción de la canal y sus anejos, y además de la indemnización obtenida por el sacrificio obligatorio se abonará una subvención complementaria en función de los kilogramos de la canal. Existe una relación a nivel nacional de todos los mataderos autorizados para realizar el sacrificio de animales positivos en las Campañas de Saneamiento Ganadero.

La declaración oficial de cualquier foco de las enfermedades sometidas a las Campañas de Saneamiento esta regulada por el reglamento de Epizootías en sus artículos 4 y 5, así como por el Real decreto 959/1986 del 25 de Abril, por el que se establece la lista de enfermedades animales de declaración obligatoria y se da la normativa para su notificación. Está prohibido todo tratamiento terapéutico frente a esta enfermedad y el tratamiento

desensibilizante frente a la tuberculosis.

La reposición de animales en explotaciones que hayan sido objeto de sacrificio obligatorio por la Campaña de Saneamiento sólo se realiza con animales que reúnan las garantías sanitarias necesarias. La titulación sanitaria de las explotaciones como oficialmente indemnes se otorgará según los requisitos exigidos por la normativa comunitaria 64/432/CEE quedando prohibido el movimiento de animales de una explotación o zona a otra que no tenga la misma calificación sanitaria.

La prevalencia de la infección en el ganado vacuno oscila entre el 0,2% en el noroeste al 8,1% en el sur. En 1994, 14.189 establos (el 5,7% de los 249.815 investigados) en España fueron positivos a la IDTB (Tabla I.10). Se chequearon el 67% de los animales censados, y el 1,6% de los animales sometidos a examen fué positivo (Tabla I.11). Si se estudia la evolución temporal de la infección (Tabla I.12) destacan dos aspectos de interés: (1) la disminución de la incidencia ha sido paulatina y progresiva en los últimos años y (2) ésta se acerca a una situación asintótica. Como conclusión puede señalarse que la erradicación total será muy lenta, con el consiguiente peligro de revertir a situaciones anteriores. Uno de los problemas de las campañas de erradicación es la reaparición de la enfermedad en establos supuestamente saneados. Las grandes lagunas que todavía existen en la epidemiología y en la caracterización de los reservorios son en buena medida responsables de estos problemas que se plantean en las campañas de saneamiento.

Tabla I.10. Prevalencia de la tuberculosis en rebaños en España. (Situación de la Sanidad Animal en España, Secretaría General de Producciones y Mercados Agrarios, Subdirección General de Sanidad Animal, M.A.P.A., 1994).

Año	Establos investigados	Establos libres (%)
1990	247.313	220.674 (89,2)
1991	261.050	236.962 (90,7)
1992	255.096	236.067 (92,5)
1993	248.875	234.169 (94,1)
1994	249.815	235.626 (94,3)

Tabla I.11. Prevalencia de la tuberculosis en ganado vacuno en España. (Situación de la Sanidad Animal en España, Secretaría General de Producciones y Mercados Agrarios del M.A.P.A., 1994).

Año	Animales censados	Animales investigados	Animales positivos (%)
1990	5.126.000	2.652.878	98.006 (3,7)
1991	5.063.000	3.217.042	118.363 (3,68)
1992	5.122.000	3.060.270	65.415 (2,13)
1993	5.059.000	3.384.637	58.162 (1,72)
1994	5.217.000	3.531.940	57.447 (1,62)

Tabla I.12. Evolución de los porcentaje de animales positivos a la tuberculosis bovina por Comunidades Autónomas (Situación de la Sanidad Animal en España, Subdirección General de Sanidad Animal, Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, M.A.P.A., 1994).

Comunidad Autónoma	Porcentajes de animales positivos a la intradermotuberculinización				
	1990	1991	1992	1993	1994
Andalucía	5-9,99	5-9,99	5-9,99	5-9,99	5-9,99
Aragón	2-4,99	2-4,99	2-4,99	1-1,99	2-4,99
Asturias	<0,99	<0,99	<0,99	<0,99	<0,99
Baleares	<0,99	<0,99	<0,99	<0,99	<0,99
Canarias	1-1,99	1-1,99	1-1,99	<0,99	<0,99
Cantabria	<0,99	<0,99	<0,99	<0,99	<0,99
Castilla y León	5-9,99	5-9,99	2-4,99	1-1,99	1-1,99
Castilla La Mancha	5-9,99	5-9,99	2-4,99	2-4,99	2-4,99
Cataluña	5-9,99	5-9,99	1-1,99	1-1,99	<0,99
Extremadura	5-9,99	2-4,99	5-9,99	2-4,99	2-4,99
Galicia	2-4,99	2-4,99	1-1,99	<0,99	<0,99
Madrid	5-9,99	2-4,99	2-4,99	2-4,99	1-1,99
Murcia	10-24,99	5-9,99	2-4,99	2-4,99	2-4,99
Navarra	1-1,99	1-1,99	<0,99	<0,99	<0,99
País Vasco	<0,99	<0,99	<0,99	<0,99	<0,99
La Rioja	1-1,99	<0,99	<0,99	<0,99	<0,99
Valencia	5-9,99	5-9,99	2-4,99	2-4,99	10-24,99

En el año 1995, los cálculos solamente de las indemnizaciones por sacrificio ascendieron a 3.694 millones de pesetas, sufragados en un 66,29% por el M.A.P.A. y en un 33,71% por las CC.AA. Esta cantidad supuso el 49,5% del total de las indemnizaciones por sacrificio de las campañas de saneamiento de enfermedades infecciosas en España. Los gastos de ejecución de la campaña de tuberculosis sumaron 1.478 millones de pesetas, repartidos entre las CC.AA. (1.441 millones) y el M.A.P.A. (37 millones).

Tabla 1.13. Gastos de ejecución e indemnizaciones previstas para 1995.

Comunidad autónoma	Animales investigados	Costes de las pruebas	Indemnización prevista
Andalucía	345.000	138.000.000	569.940.800
Aragón	54.000	21.600.000	153.400.000
Asturias	383.061	153.224.400	104.311.401
Baleares	13.084	5.233.600	6.060.000
Canarias	19.000	7.600.000	8.000.000.
Cantabria	321.000	128.400.000	48.120.000
Castilla y León	800.000	320.000.000	840.000.000
Castilla La Mancha	108.207	43.282.800	105.495.000
Cataluña	195.000	78.000.000	181.350.000
Extremadura	355.987	142.394.800	1.079.940.000
Galicia	785.000	314.000.000	474.680.000
Madrid	45.000	18.000.000	45.700.000
Murcia	6.500	2.600.000	15.785.000
Navarra	75.936	30.374.400	14.850.000
País Vasco	145.200	58.080.000	15.400.000
La Rioja	21.250	8.500.000	2.650.000
Valencia	22.000	8.800.000	28.600.000
Total	3.695.225	1.478.090.000	3.694.282.204

En 1996 se investigarán 3.703.619 animales, y se preveen de 44.008 a 44.162 animales positivos (1,19% positividad). Las pruebas de los animales costarán 921.600.000 millones de pesetas (el 29,25% del total de ejecución de las campañas), más 2.727.949.262 en indemnizaciones (un 47% del total de indemnizaciones), con una financiación prevista del

70,25% por parte del M.A.P.A. y el 29,75% de las CC.AA, con un posible reembolso por parte del fondo veterinario de la Unión Europea del 50% (11.400 mega ECUS) sobre ambas partidas.

7.1.2. Patogénesis de las lesiones en el ganado vacuno

a. Tuberculosis pulmonar

La tuberculosis pulmonar a menudo comienza en la unión bronquioloalveolar, generalmente en la localización subpleural en las porciones dorsocaudal del lóbulo diafragmático (Jubb et ál, 1980) y se extiende hacia los alveolos. Las lesiones tempranas son pequeñas y no están encapsuladas, sino rodeadas por tejido alveolar condensado. Los focos iniciales pueden coalescer y formar grandes áreas de bronconeumonía caseosa.

El aspecto de las lesiones pulmonares varía con su edad y velocidad de diseminación. Las lesiones caseificadas pueden encapsularse y calcificarse, pero las cápsulas no son signos evidentes de curación, ya que muchos comunican con un bronquiolo, permitiendo la diseminación local (Jubb et ál, 1980). Los focos iniciales pueden fusionarse entre sí y formar grandes nódulos de bronconeumonía caseosa. Sin embargo, la extensión es principalmente broncogénica, por contigüidad, y la velocidad difiere de un caso a otro.

Se denomina bronconeumonía acinosa caseosa si se encuentran pequeños focos de caseificación en el interior de los lobulillos afectados; bronconeumonía lobulillar caseosa si la totalidad del lobulillo está afectado; y neumonía caseosa crónica cuando hay grandes zonas irregulares de caseificación. Estas tres formas de tuberculosis pulmonar pueden coexistir en un mismo pulmón (Jubb et ál, 1980). Junto con la tuberculosis crónica es frecuente encontrar úlceras en la tráquea y en los bronquios.

b. Tuberculosis intestinal

Las infecciones intestinales son poco corrientes y pueden estar debidas a la deglución de esputos contaminados. Suelen tomar la forma de complejos incompletos, bien porque no provoquen reacción en la pared intestinal o porque la lesión primaria sea muy pequeña. Las

úlceras, de tamaño variable con bordes duros y algo elevados, aparecen cubiertas de un exudado caseoso seco o por un tejido de granulación con hemorragias diminutas.

c. Tuberculosis generalizada

La diseminación puede ocurrir vía hematógica o linfática, alcanzando otros órganos en los que produce metástasis, principalmente el hígado, los riñones, la ubre, las meninges y las cavidades serosas. Puede tomar la forma de tuberculosis miliar aguda o de tuberculosis crónica. El curso de la enfermedad tras una generalización masiva es corto, y el cuadro patológico se denomina tuberculosis miliar (Jubb et ál, 1980). Las lesiones miliares del pulmón son tubérculos típicos, pequeños, grisáceos y traslúcidos, que pronto se caseifican y calcifican. Aparecen uniformemente diseminados por ambos pulmones.

La generalización de la infección (diseminación a otros órganos) puede ser muy precoz en el curso de la enfermedad (generalización postprimaria) o tardía (generalización tardía), cuando la resistencia primaria del hospedador ha sido superada. Esta puede ser repentina y masiva si entran grandes cantidades de bacilos en la corriente sanguínea produciendo una tuberculosis miliar, o más lenta, originando lesiones de mayor tamaño y diferentes edades (Jubb et ál, 1980; Blood et ál, 1989).

d. Tuberculosis de las serosas

Una característica de la tuberculosis bovina es la tendencia a difundirse a las membranas serosas por expansión directa o por extensión linfógena o hematógica. La pleura aparece engrosada por un tejido fibroso de granulación. Las lesiones características son nodulares y tienden a presentarse en acúmulos que se calcifican posteriormente denominándose tuberculosis perlada (Jubb et ál, 1980). La pleuritis caseosa difusa, con acúmulos de exudado caseoso entre las hojas engrosadas de la pleura, es menos común (Dungworth, 1985).

Las lesiones en el peritoneo son menos frecuentes que las de la pleura. Pueden ocurrir en las tuberculosis congénitas a través de difusión linfógena a partir de los ganglios linfáticos portales, de origen hematógico en las generalizaciones postprimaria y tardía, o por extensión

de una tuberculosis intestinal ulcerativa (Jubb et ál, 1980). Las lesiones son similares a las de la pleura, aunque más blandas y con abundante tejido de granulación en el que aparecen incluídos los tubérculos.

e. Tuberculosis hepática y renal

Las lesiones hepáticas pueden ser nodulillos milares o lesiones nodulares. Los ganglios portales aparecen afectados. Las lesiones renales se parecen a las hepáticas. Si la erosión afecta a la pelvis renal la infección desciende por el tracto urinario. Con frecuencia también aparecen afectados los ganglios linfáticos renales.

f. Tuberculosis ósea y del sistema nervioso

La tuberculosis ósea es una osteomielitis; se localiza principalmente en vértebras, costillas y epífisis de los huesos largos. La caseificación es extensa, con tendencia a la licuefacción y la formación de abscesos. Las lesiones licuadas terminan por fistulizar a través de la cortical, erosionando los cartílagos articulares y produciendo artritis tuberculosa.

La tuberculosis del sistema nervioso central es una meningitis que afecta principalmente a las meninges cerebrales por difusión hematógica. Las lesiones son similares a las de las membranas serosas, pero más exudativas y necrosantes (Jubb et ál, 1980).

g. Tuberculosis mamaria

La infección de la ubre afecta a menos del 2% de los animales (Timonei et ál, 1988), pero es importante dada su implicación en la Salud Pública ya que todos los casos de tuberculosis mamaria son casos abiertos (Jubb et ál, 1980). La glándula mamaria se afecta únicamente con caracter secundario a los pulmones. La infección es hematógica, con posterior difusión canalicular. Puede oscilar de tuberculosis caseosa a miliar diseminada. La tuberculosis crónica es la forma más común. La tuberculosis miliar diseminada se desarrolla como parte de una generalización precoz, y es rara incluso en efectivos altamente infectados (Jubb et ál, 1980). Las lesiones son similares a las de la tuberculosis miliar en cualquier otro punto, con abundantes nódulos de aproximadamente 1 cm de diámetro.

7.1.3. Localización de las lesiones

Los ganglios linfáticos bronquiales, mediastínicos (anterior y posterior), y retrofaríngeos mediales son los órganos más habitualmente afectados. Las pequeñas lesiones pulmonares no son fácilmente localizables (Jubb et ál, 1980; Timonei et ál, 1988). Otros órganos que deben inspeccionarse en la necropsia incluyen: (1) en la cabeza, los ganglios linfáticos mandibulares, parotídeos, retrofaríngeos laterales, y las tonsilas; (2) en el tórax, los ganglios linfáticos traqueobronquiales (lateral y medial) además del pulmón; (3) en el abdomen, el hígado y los ganglios linfáticos asociados, el bazo, los riñones y los ganglios linfáticos mesentéricos; y (4) en la carcasa, los ganglios linfáticos preescapular, prefemoral, superficial inguinal (supramamario), poplíteo, e ilíacos interno y lateral (Corner et ál, 1990).

La media de lesiones en los animales naturalmente infectados oscila entre 1,3 y 2, situándose la mayoría en la cavidad torácica (McIlroy et ál, 1986; Crews, 1991). El 70 % de las lesiones tienen menos de 1 centímetro de diámetro, y más del 60 % de los pulmones presentan una única lesión (McIlroy et ál, 1986).

Las lesiones son características, pero debe hacerse un cuidadoso diagnóstico diferencial con las lesiones producidas por *Actinobacillus*, *Rhodococcus equi* y *Mucor* (Rogers et ál, 1980; Blood et ál, 1989; Duffield et ál, 1989).

7.1.4. Sintomatología

La tuberculosis es una enfermedad progresiva, debilitante, con emaciación crónica, fiebre irregular y ocasionalmente tos, que acaba con la vida del animal. Los signos clínicos dependen de la localización de las lesiones.

La enfermedad pulmonar (bronconeumonía) está caracterizada por tos aislada, baja y húmeda. En casos avanzados, cuando es mayor la destrucción del pulmón, se hace aparente una disnea con respiración acelerada. Por auscultación y percusión pueden detectarse áreas macizas sin sonidos de respiración (Blood et ál, 1989).

La infartación de los ganglios linfáticos retrofaríngeos causa disfagia y respiración ruidosa debida a la obstrucción de la faringe (Blood et ál, 1989).

La metritis tuberculosa interfiere con la gestación o produce continuos abortos (Blood et ál, 1989). Un exudado viscoso separa la placenta del endometrio, con focos caseonecróticos en los cotiledones (Jubb et ál, 1980). Si el ternero llega a nacer, muere por tuberculosis generalizada, ya que la tuberculosis congénita de los terneros progresa rápidamente. El complejo primario se encuentra en el hígado y en los ganglios linfáticos portales, existiendo también lesiones en el pulmón y ganglios linfáticos regionales y en el bazo (Jubb et ál, 1980).

La mastitis tuberculosa se caracteriza por una hipertrofia con marcada induración que se desarrolla especialmente en la parte superior de los cuarterones traseros, sin síntomas de inflamación aguda. Las zonas afectadas aparecen abultadas e irregulares, con aspecto caseoso seco. Los ganglios linfáticos supramamarios están infartados. En los estadios iniciales la leche es macroscópicamente normal, aun conteniendo bacilos, pero posteriormente aparecen flóculos (coágulos de exudado caseoso) (Blood et ál, 1989) que sedimentan dejando un líquido seroso ambar claro con un gran número de bacilos (Jubb et ál, 1980). *Nocardia asteroides* y *Cryptococcus neoformans* pueden también producir mastitis granulomatosas bovinas.

7.1.5. Infección por otras micobacterias

La infección con *M. avium* es generalmente subclínica. Si existen lesiones, suelen localizarse en los ganglios linfáticos mesentéricos y retrofaríngeos. Estas lesiones son pequeñas, y están encapsuladas y calcificadas. La difusión a otros órganos (serosas, ubre, pulmón, hígado, riñón y bazo) es rara. Histológicamente se observa la presencia de grandes cantidades de células epitelioides y bacilos pleomórficos acidoalcohol resistentes (Jubb et ál, 1980).

M. tuberculosis causa lesiones pequeñas y no progresivas en el ganado.

7.1.6. Diagnóstico *in vivo* de la tuberculosis

a. Test de la tuberculina

El test de la tuberculina ha sido utilizado para el diagnóstico de la tuberculosis en el ganado vacuno desde hace casi 100 años. Esta prueba está basada en una respuesta de hipersensibilidad retardada a la tuberculina a las 72 horas en el punto de inoculación. A pesar de sus limitaciones ha sido utilizado como base de los programas de saneamiento, y su uso ha hecho posible erradicar la enfermedad en varios países mediante pruebas periódicas y eliminación rápida de los animales positivos.

Las determinaciones de la sensibilidad y la especificidad de esta prueba varían ampliamente según los experimentos y países en los que se realizaron. Los experimentos para establecer ambos parámetros son limitados, principalmente por la gran cantidad de recursos humanos y económicos requeridos, ya que es necesario la necropsia y el examen histológico y microbiológico de todos los animales estudiados (Francis et ál, 1978). En la práctica dependen de la prevalencia de la infección en la población sometida a la prueba, cuanto mayor sea la prevalencia más probable es que un resultado positivo indique un animal infectado; así, el valor predictivo es más alto en los inicios de una campaña de erradicación, y disminuye a lo largo del curso de ésta.

b. Tuberculinas

La tuberculina vieja de Koch (*old tuberculin*, OT) estaba producida al reducir por evaporación, a una décima parte, un caldo con glicerol en el que había crecido el bacilo. La concentración por calor desnaturalizaba parcialmente las proteínas, haciéndola menos específica (Francis et ál, 1973). Además era una mezcla compleja, con considerables variaciones de un lote de fabricación a otro. Tras un estudio en 1.000 pacientes humanos tuberculosos y 750 sanos se alcanzó la conclusión de que las reacciones obtenidas con dosis superiores a la dilución de la OT 1/10 no eran específicas (D'Arcy Hart, 1932).

La producción de tuberculina por concentración de un medio sintético (*heat concentrated synthetic medium*, HCSM) estaba producida de forma similar, pero el nitrógeno

para el crecimiento de las micobacterias era exclusivamente aportado por la asparagina (Dorset, 1934), por lo que toda la proteína presente en el producto final era de origen bacteriano.

La producción de una tuberculina purificada se consiguió mediante precipitación de ésta con ácido tricloroacético (*trichloroacetic acid precipitated tuberculin*, TPT) (Seibert et ál, 1932; Green, 1946), o con sulfato amónico (Seibert, 1934; Long et ál, 1935) para obtener el derivado de proteína purificada (*purified protein derivative*, PPD). La PPD es más fácilmente estandarizable, más potente por unidad de peso, y más específica que las anteriores (Francis et ál, 1973).

Las dosis recomendadas para diagnóstico en seres humanos son 0,02 µg (1 unidad tuberculínica), 0,1 µg y 0,5 µg (Long et ál, 1934; Palmer, 1953). Para su uso diagnóstico veterinario en vacuno, las dosis recomendadas son 0,2 mg y 0,1 mg (0,1 ml de tuberculina de 2 mg PPD bovina/ml o 1 mg PPD bovina/ml). La dosis de 0,2 mg detecta el 95% de los animales infectados, con un 81-88.3% de especificidad; la dosis de 0,1 mg detecta el 80% de los animales tuberculosos, con un 11% de falsas reacciones positivas (Lepper et ál, 1977; Lepper et ál, 1979).

La actividad de la tuberculina varía de un lote a otro en condiciones difíciles de controlar, y puede ser muy inestable cuando está diluída (Ortega et ál, 1980). En realidad son mezclas complejas de proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, que incluyen una gran variedad de antígenos, muchos de los cuales son comunes a diversas especies de micobacterias (Monaghan et ál, 1994). Varios antígenos de *M. bovis* han sido caracterizados (Fifis et ál, 1991), destacando entre ellos el MPB70. La contribución de los distintos antígenos en la respuesta del ganado a la tuberculina es prácticamente desconocida. La respuesta frente a la proteína de la pared celular (*cell wall protein*, CWP) y del complejo peptidoglicano (CWP-PG) de *M. bovis* no permite la diferenciación de *M. bovis* y *M. avium* (Angus et ál, 1989).

Las tuberculinas PPD son las más ampliamente utilizadas en la actualidad, aunque la

directiva de la Unión Europea 80/219/EEC admite también la tuberculina HCSM. La tuberculina bovina es más específica que la humana (preparada con *M. tuberculosis*), origina menos reacción frente a otras infecciones, especialmente las de tipo aviar (Francis et ál, 1973). La tuberculina bovina se produce con la cepas de *M. bovis* AN5 o Vallec, y la aviar con *M. avium* D4ER o TB56. El contenido en proteína de la tuberculina no permite predecir su actividad biológica, por lo que cada lote de fabricación debe ser probado en animales y comparando con unos estándares de referencia. Esta comparación, que idealmente debería realizarse en ganado tuberculoso, se efectúa en cobayas. La validación de la potencia está también regulada por la directiva 80/219/EEC.

c. Reacción a la tuberculina

La respuesta a la tuberculina en los animales infectados es una reacción de hipersensibilidad retardada, mediadas por poblaciones de linfocitos T sensibilizados (Gorman et ál, 1989). La reacción alcanza su máximo a las 48-72 horas *postinoculación* (Lepper et ál, 1977; Francis et ál, 1978). Estas reacciones tienen componentes específicos, dependientes de la interacción entre células T CD4⁺ previamente sensibilizadas y antígenos presentados por macrófagos en asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, y componentes no específicos, desencadenados por la liberación de citoquinas por las células T activadas responsables del daño tisular.

d. Pruebas tuberculínicas en uso

La prueba de la tuberculina simple

La prueba de la tuberculina simple (*single intradermal test*, SIT) se realiza en la piel del cuello en Europa y en el pliegue caudal, en EE.UU, Australia y Nueva Zelanda.

La realización de la prueba en el cuello está legislada en la directiva 80/219/ECC. La inyección de 0,1 ml de tuberculina (equivalente a 2.000 unidades tuberculínicas comunitarias) se realiza entre el tercio anterior y medio del cuello. La interpretación se basa en las observaciones clínicas y en el incremento del grosor de la piel. Un incremento menor de 2 mm, sin signos clínicos locales (edema, exudación, dolor o necrosis) se considera negativo. Un aumento entre 2 y 4 mm es dudoso. Una reacción se considera positiva si es mayor de

4 mm o si existen signos clínicos. Los animales pueden ser sometidos a la prueba del SICTT al menos 42 días más tarde (Monaghan et ál, 1994).

Para la prueba en el pliegue caudal se utiliza un punto a 7 cm de la base de la cola. El ganado se considera negativo cuando no se detecta ninguna respuesta en el punto de inoculación; la respuesta clasificaría a un animal como sospechoso o reactor. Éstos pueden ser sacrificados, o sometidos al SICTT en menos de 10 días o 60 días más tarde de la primera inoculación. La realización de SICTT en menos de diez días, conocido como intervalo corto, tiene alta especificidad, pero una sensibilidad del 74% (Roswurm et ál, 1973). No está aconsejado en áreas donde *M. bovis* es endémico ya que puede enmascarar animales que si serían positivos al repetir la prueba a los sesenta días, y en los cuales se detectan lesiones de tuberculosis en el examen *postmortem* (Hoyle, 1990; Monaghan et ál, 1994).

La sensibilidad de la prueba cervical con PPD bovina es el 91,2% y la especificidad es el 75,5% (deJongh et ál, 1969; Lesslie et ál, 1975). La sensibilidad de la prueba en el pliegue caudal con tuberculina HCSM es 87,9% y la especificidad 90,8% (Robertson, 1963; deJongh et ál, 1969; Francis et ál, 1978); con PPD la sensibilidad es menor, 81,9%, y la especificidad mayor, 96,3% (Lepper et ál, 1977; Francis et ál, 1978). Según otros estudios la sensibilidad es bastante más reducida, solamente el 65,6% (Wood et ál, 1991). En general, se considera que la sensibilidad de la tuberculina es mayor si la prueba se realiza en el cuello, y que la especificidad es mayor en el pliegue caudal (Francis et ál, 1978).

Los animales clasificados como positivos con base en su respuesta frente a la tuberculina pero sin lesiones visibles que evidencien la infección se consideran como reactores inespecíficos (*no visible lesion*, NVL). El hallazgo continuado de un porcentaje alto de animales NVL en un detallado examen *postmortem*, disminuye el nivel de credibilidad en el test y lleva a la interpretación más relajada de los resultados y a la desconfianza por parte de los ganaderos en la erradicación de la infección. La tasa de animales NVL disminuye utilizando protocolos de necropsia adecuados (Corner et ál, 1990).

La prueba comparativa

La prueba intradérmica comparativa (*single intradermal comparative tuberculin test*, SICTT) se utiliza en Irlanda y Reino Unido como prueba rutinaria para la detección de animales infectados y en otros países para comprobar la situación de infección demostrada por el SIT. Las tuberculinas bovina y aviar (2.000 unidades, comunitarias e internacionales, respectivamente, en un volumen de 0,1 ml) son inyectadas intradérmicamente en el cuello en dos puntos separados 12,5 cm. La reacción es positiva si la respuesta a la PPD bovina es 4 mm mayor que la respuesta a la PPD aviar o si existen signos clínicos locales, es dudosa si es entre 1 y 4 mm, y es negativa si es inferior. Los animales dudosos pueden ser sometidos a una nueva prueba 42 días después.

La especificidad de esta prueba en poblaciones libres de tuberculosis es muy alta, 99%, (Leslie et ál, 1975; Duffield et ál, 1985), pero la sensibilidad varía dependiendo de los estudios (Monaghan et ál, 1994) entre el 72% (Francis et ál, 1978), el 77% (deJongh et ál, 1969) y el 95% (O'Reilly et ál, 1975).

e. Falsos positivos a la prueba de la tuberculina

Conforme progresa una campaña de erradicación y los niveles de prevalencia de *M. bovis* decaen, aumenta la proporción de animales positivos a la prueba que no muestran evidencia de lesiones de tuberculosis en el sacrificio, a pesar de la estandarización de la tuberculina y de los protocolos de necropsia (Hagan, 1931; Robertson, 1963, Chávez, 1983). El porcentaje de estos animales varía ampliamente, alcanzando el 26,4% (Suther et ál, 1974). En los países de Europa continental es menor, en Reino Unido y Nueva Zelanda afecta entre el 8 y el 12% de los animales positivos a la prueba (Leslie et ál, 1975).

Al principio, muchos de los reactores NVL aparecían en rebaños con solamente un pequeño número de animales tuberculosos, es decir, la frecuencia de los animales NVL era inversamente proporcional al número de animales infectados en la granja. Probablemente, las posibles lesiones no se descubrieron en las autopsias de rutina (Hastings, 1933). Se les consideró animales con tuberculosis incipiente, pero en este caso, el número de estos animales debería también reducirse al progresar las campañas (Hagan, 1931; Lesslie, 1970).

Actualmente, estos casos se atribuyen a sensibilizaciones no específicas, principalmente con *M. avium*, *M. paratuberculosis*, tuberculosis cutánea (*skin tuberculosis*) o exposición a micobacterias ambientales y otros microorganismos relacionados (Hastings et ál, 1930; Worthington, 1967; Pearson et ál, 1977; Corner et ál, 1978; Ketterer et ál, 1981; Corner, 1981).

El ganado infectado con *M. paratuberculosis*, así como el vacunado, puede presentar dificultades en la interpretación. La respuesta a la tuberculina aviar y a la paratuberculina (johnina) es similar (Hagan et al., 1929). Los animales expuestos al complejo *M. avium-intracellulare-scrofulaceum* por contacto con cerdos o aves infectadas (Brown et ál, 1981), tienen reacciones significativas a la tuberculina mamífera y aviar (Plum, 1931). Los microorganismos pertenecientes a este complejo se aíslan del 30% de los animales NVL (Francis et ál, 1978). El 60% de los animales inoculados con cepas de este complejo (serotipos 6, 14 y 18), aisladas de lesiones típicas de tuberculosis en vacas, responden a la PPD bovina, aunque ésta es menor que la respuesta a la PPD aviar en el test comparativo (Ketterer et ál, 1981).

Los animales con tuberculosis cutánea, inflamaciones nodulares que siguen los vasos linfáticos de las extremidades, de agente etiológico desconocido, muestran una fuerte reacción a la tuberculina de *M. tuberculosis*, pero menor a la bovina (Leslie et ál, 1975).

Las micobacterias consideradas atípicas se encuentran habitualmente en el suelo, el agua, en los pastos y en el tracto digestivo de los herbívoros (Crawford, 1926; Corner et ál, 1977; Shield, 1983; Kazda et ál, 1988). Son aisladas también a partir de muestras animales: de ganglios linfáticos del 58,6% de los animales reactivos a la tuberculina, con o sin lesiones visibles (Claxton et ál, 1979; Chávez et ál, 1981; Duffield et ál, 1985), y del 81,3 al 89,4% de las heces (Sánchez et ál, 1980; Chávez et ál, 1981; González et ál, 1983). Las micobacterias atípicas más frecuentemente aisladas son *M. terrae*, *M. vaccae*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. gastri*, *M. aquae*, *M. flavescens* y *M. triviale*.

Algunas especies (*M. flavescens*, *M. simiae*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*,

M. xenopi) son capaces de sensibilizar al ganado frente a la tuberculina por inoculación de estas saprofitas ácido-alcohol resistentes (Corner et ál, 1977; Corner et ál, 1979). La duración de dicha sensibilización puede ser corta, entre 4 y 10 semanas, o alcanzar los 4 meses, dependiendo de la inoculación (Corner, 1981). *M. cookii*, aislada de un estanque en Nueva Zelanda, es capaz de sensibilizar a cobayas y al ganado (Kazda et ál, 1988; Kazda et ál., 1989; Monaghan et ál, 1991). La sensibilización del ganado a la tuberculina podría ocurrir por ingestión de agua contaminada con estas micobacterias (Kazda et al. 1988).

No existe correlación entre la presencia de lesiones macroscópicas, la sensibilidad a la PPD bovina y el aislamiento de las micobacterias varias semanas después de la infección (Corner et ál, 1978). Generalmente pueden ser diferenciados mediante conocimiento de la historia previa de la explotación, realización de pruebas repetidas y el uso del test comparativo (Edwards et ál, 1960; Leslie et ál, 1975; Kazda et ál, 1988). El 75% del ganado infectado con micobacterias atípicas muestran reacciones frente a la PPD bovina a las 24 horas, el 50% a las 72 horas y la mayoría son negativas a las 96 horas (Lepper et ál, 1979). Las reacciones frente a su antígeno homólogo (preparado con el microorganismo inoculado al animal) son siempre más marcadas, mientras que las reacciones frente a antígenos heterólogos tienden a ser menos marcadas, de tamaño más variable e inconstantes (Crawford, 1927). La tabla de los "factores de especificidad" (Green, 1946) relaciona las tuberculinas PPD humana, bovina, BCG, de John, aviar y de *M. phlei*, denominando como factor de especificidad las unidades de peso de un PPD heterólogo que desencadena una respuesta de la misma intensidad que el PPD homólogo. Obtuvo reacciones cruzadas con los seis preparados, pero estos factores oscilaron entre 1 (para grupos estrechamente relacionados) hasta 100-150.

f. Falsos negativos a la prueba de la tuberculina

Los dos principales factores que afectan a la coherencia de los resultados de la investigación de animales sospechosos son las variaciones del propio método y las derivadas del observador.

La capacidad de reacción a la tuberculina aparece de 30 a 50 días *post* infección

(Francis, 1947). Los animales con enfermedad severa y generalizada pueden no reaccionar a la prueba (Lepper et ál, 1977), esta condición se denomina anergia. Sin embargo, no existe una relación obvia entre el grado de infección, o la actividad de las lesiones, y la falta de respuesta a la PPD (Lepper et ál, 1977). En una población sometida a saneamiento regular durante varios años, el número de animales anérgicos con tuberculosis generalizada debería ser muy bajo (Neill et ál, 1994). Además, un significativo número de animales en los estadios iniciales de la infección no responden a la prueba de la tuberculina (Neill et ál, 1994). Estos animales plantean problemas en el desarrollo de las campañas de erradicación (Armstrong, 1981).

La utilización de tuberculina de baja potencia incrementa la tasa de falsos positivos. En Europa los lotes pueden ser utilizados dos años, protegidos de la luz y conservados en refrigeración. La reducción de las dosis reduce progresivamente el tamaño de la reacción.

La desensibilización (reducción de la capacidad de reacción de un animal tuberculoso durante el período siguiente a la inyección de la tuberculina afecta a la mitad de los animales, y aparece desde los 4 a 7 días hasta los 42 y 60 días, tras los cuales la reacción alcanza los niveles previos (Radunz et ál, 1985).

La inmunosupresión durante el *postparto* en algunos animales dura aproximadamente entre cuatro y seis semanas (Kerr et ál, 1946; Kehrli et ál, 1989). En seres humanos y animales de laboratorio se ha detectado ausencia de respuesta también en estados de malnutrición (Harland et ál, 1965; Bell et ál, 1986; McMurray et ál, 1989).

La falta de respuesta también puede deberse al tratamiento fraudulento de los animales con dexametasona, en un intento de ocultar ganado reactor (Monaghan et ál, 1994).

g. La detección de interferón gamma

Los primeros estudios para el desarrollo de métodos para evaluar *in vitro* la reacción de las células T de ganado infectado con *M. bovis* se centraron en el test de la transformación de linfocitos (*lymphocyte transformation test*, LTT) (Outteridge et ál, 1973; Thoen et ál,

1980). Existe una correlación entre la respuesta de los linfocitos *in vitro* y la reacción a la tuberculina (Miller et ál, 1973; Nilsson et ál, 1973), pero este test es capaz de detectar el ganado infectado antes de que se desarrolle la hipersensibilidad de tipo retardado (Muscoplat et ál, 1975). El LTT detectaba respuestas específicas a la PPD, pero presentaba varias dificultades para su aplicación en el diagnóstico. La necesidad inicial de aislar y cultivar los linfocitos fue eliminada con la utilización de sangre completa diluída en medio de cultivo tisular (Muscoplat et ál, 1977).

La proliferación de los linfocitos, originalmente puesta de manifiesto mediante la utilización de nucleósidos radiactivos, fue sustituída por la detección de gamma-interferón (IFN- γ). Los animales infectados con *M. bovis* tienen linfocitos circulantes sensibilizados frente a los antígenos de las micobacterias. Los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ responden a la estimulación *in vitro* con PPD bovino, secretando IFN- γ . La producción de esta citoquina está estrechamente relacionada con la proliferación linfocitaria (d'Andrea et ál, 1986). En el 99,5% de los animales normales los niveles de IFN- γ en la sangre son indetectables (Jones et ál, 1992).

La presencia de IFN- γ se detectó inicialmente mediante un bioensayo (Wood et ál, 1990a). Posteriormente, la producción de anticuerpos monoclonales (IFN-2 e IFN-9, ambos del tipo IgG₁) frente a IFN- γ (Wood et ál, 1990) permitieron desarrollar una prueba inmunoenzimática que fue evaluada en un grupo de animales infectados experimentalmente (Rothel et ál, 1990). Para evitar el problema de las reacciones cruzadas se utiliza un ensayo comparativo en el que pequeños volúmenes de sangre completa heparinizada (1,5 ml) se incuban con tampón fosfato, y PPD bovino y aviar (20 μ g/ml) durante 16-24 horas. El nivel de IFN- γ se detecta al someter los plasmas (separados por centrifugación) al EIA. Se considera positivo cuando la absorbancia de la muestra estimulada con PPD bovino es mayor que las absorbancia de las otras dos muestras. El EIA es de tipo sandwich, y está producido comercialmente por CSL Limited (Parkville, Australia). Detecta 50-80 pg/ml de IFN- γ biológicamente activo, de origen bovino, ovino o caprino (Rothel et ál, 1990; Jones et ál, 1992).

En pruebas de campo, y dependiendo del criterio de positividad seleccionado (Wood et ál. 1991), la sensibilidad del IFN- γ para la detección de la tuberculosis bovina osciló entre el 81,2 y el 93,6%, comparada con el 65,6% del test de la tuberculina. La especificidad del IFN- γ fue 96,2-99,1%, cercana al 98,8% de la tuberculina (Wood et ál., 1991; Wood et ál, 1992). El 26,4% de los animales infectados (de cuyas muestras se aisló *M. bovis*) solamente pudieron ser detectados por el test de IFN- γ . La anergia al test de la tuberculina no estaba asociada a una enfermedad generalizada, sino probablemente al estrés por las condiciones de manejo (Wood et ál, 1991). El método del IFN- γ permite la detección de animales infectados, algunos eliminando bacilos en las secreciones respiratorias, pero tuberculina negativos (Neill et ál, 1994).

Una ventaja del test del IFN- γ es que los animales pueden ser sometidos a las pruebas repetidamente (Wood et ál, 1994). En los animales infectados con *M. bovis* la prueba de la tuberculina afecta al resultado del test de IFN- γ , observándose una disminución en la liberación de esta citoquina durante 7 días, y después una intensificación gradual que dura aproximadamente dos meses (Rothel et ál, 1992).

La utilización de antígenos específicos, junto con el EIA, permite detectar la inmunidad mediada por células (*cell mediated immunity*, CMI) para el diagnóstico de otras infecciones, por ejemplo, de la paratuberculosis (Billman-Jacobe et ál, 1991). La medida del IFN- γ liberado por cultivos *in vitro* ha sido también utilizado para la valoración de la respuesta inmunológica frente a vacunas y adyuvantes (Emery et ál, 1990).

El test del IFN- γ está aceptado como prueba diagnóstica de la tuberculosis bovina en Australia, y se encuentra en fase de comprobación en EE.UU., Nueva Zelanda e Irlanda (Wood et ál, 1994). El coste unitario es mayor que el de la tuberculina, pero debido a su mayor sensibilidad su aplicación es altamente recomendable en rebaños problemáticos.

h. Pruebas serológicas

La respuesta de anticuerpos en las infecciones por micobacterias es baja y no tiene un papel protector significativo (Grange, 1984; Krambovitis, 1987). Está relacionada con el grado

de multiplicación y carga antigénica de los individuos (Brooks et ál, 1988; de Lisle et ál, 1980), estando presente en aproximadamente el 75% de los animales con tuberculosis activa, pero ausente en ganado infectado sin sintomatología (Ritacco et ál, 1990). En algunos casos, en estadios muy avanzados de la enfermedad, la respuesta humoral es elevada (Grange, 1984; Plackett et ál, 1989). Por lo tanto, un test serológico asociado a un test basado en la respuesta de base celular proporcionaría el mayor número de animales correctamente diagnosticados. Su utilización está recomendada para la detección de animales anérgicos al test de la tuberculina, como prueba complementaria (Plackett et ál, 1989).

Los primeros ensayos serológicos, como la fluorescencia indirecta, la aglutinación y la fijación de complemento, utilizando preparaciones de antígenos sin purificar, demostraron una amplia reactividad cruzada con suero de animales no infectados o infectados con otras micobacterias. Además de baja especificidad, estos tests tenían baja sensibilidad (Vardaman et ál, 1964; Yugi et ál, 1972; Lepper et ál, 1975).

Los primeras pruebas de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) para la detección de la tuberculosis bovina utilizaron PPD (derivado de proteína purificada) como antígeno (Thoen et ál, 1983), con una sensibilidad del 73,6% (Ritacco et ál, 1990). La especificidad de la prueba es menor si se emplean como antígeno preparaciones de *M. bovis* sonicadas, 52,6% en rebaños libres de tuberculosis y nunca sometidos a la intradermoreacción (Auer, 87; Auer et ál, 1988), probablemente por la presencia de proteínas de choque térmico (Fifis et ál, 1991). Animales experimentalmente infectados con diferentes serovariedades de MAIS y con *M. flavescens* producen anticuerpos frente a este tipo de antígeno (Auer et ál, 1988). La sensibilidad es también insuficiente, detectando el 88,7% de los animales tuberculina positivos y el 63% de los animales infectados en los que nunca se ha realizado la prueba de la tuberculina (Auer, 87).

Utilizando como antígeno preparaciones sonicadas de *M. bovis* y MAIS pueden detectarse el 71,3% de los animales infectados, pero solamente el 15,3% presenta una respuesta específica frente a *M. bovis* (Dowling et ál, 1991). El alto porcentaje de respuestas no específicas representa una mayor exposición a otras micobacterias ambientales, o que la

respuesta inmunológica del ganado se centra más en antígenos comunes que en antígenos específicos (Dowling et ál, 1991). El ganado con tuberculosis cutánea, *M. paratuberculosis*, *Rhodococcus equi* y *Nocardia asteroides* tiene anticuerpos frente a filtrado de cultivo (Plackett et ál, 1989).

Las pruebas de ELISA que detectan anticuerpos frente a fosfátidos son más sensibles que las dirigidas a los componentes de la PPD, existiendo una correlación directa en animales experimentalmente infectados, aparición de los signos clínicos y la detección de la respuesta humoral (Hanna et ál, 1989).

La inoculación de tuberculina produce un incremento en la respuesta humoral en los animales infectados que previamente no tenían niveles detectables de anticuerpos frente a antígeno crudo, PPD o MPB70 (Richards et ál, 1966; Yugi et ál, 1972; Ritacco et ál, 1987; Harboe et ál, 1990; Dowling et ál, 1991; Hanna et ál, 1992); aunque no induce un aumento significativo en los animales no infectados (Harboe et ál, 1990), o afecta solamente a 2 de cada 10 (Ritacco et ál, 1990). Al ser esta estimulación principalmente frente a antígenos comunes puede afectar negativamente a la especificidad si se utiliza antígeno crudo o PPD para la prueba serológica (Dowling et ál., 1991).

Debido a las numerosas reacciones cruzadas entre las especies del género (Daniel et ál, 1978), la investigación se centró en la búsqueda de antígenos específicos (Nagai et ál, 1981; Harboe et ál, 1984; Fífis et ál, 1991). La aplicación de la proteína MPB70, específica de *M. bovis*, incrementa la especificidad, pero la sensibilidad de la prueba es insuficiente (Fífis et ál, 1989; Harboe et ál, 1990). Sin embargo, ni la MPB70 ni la MPB64 son enteramente específicas de *M. bovis*, por lo que continúan existiendo falsas reacciones positivas con sueros de animales no infectados (Fífis et ál, 1992; Wood et ál, 1992). Los animales con tuberculosis cutánea (*skin tuberculosis*) tienen títulos frente a la MPB70 muy altos (Wood et ál, 1994).

La elaboración de anticuerpos frente a la MPB70 es baja, aunque la respuesta varía considerablemente entre individuos (Wood et ál, 1994). La prueba de la tuberculina induce

un fuerte efecto anamnésico en los animales infectados con *M. bovis* (Wood et ál, 1994). La sensibilidad de este ELISA es 49,5 y 12,5-18,1% (con y sin efecto anamnésico respectivamente); la especificidad es 96,4-98,2% (Wood et ál, 1992; Wood et ál, 1994). La mayoría de los animales con respuesta positiva en este test fueron negativos en las pruebas del IFN- γ y de la tuberculina (Wood et ál, 1992).

Las evidentes baja sensibilidad y especificidad incapacitan estos tests como alternativa rutinaria a la tuberculina, pero pueden detectar una proporción (aunque no todos) de los animales anérgicos, pero a costa de incrementar a la vez los falsos positivos (Plackett et ál, 1989).

7.1.7. Control de la infección

La detección de los animales infectados depende de la utilización de la prueba de la tuberculina. La sensibilidad de la tuberculina, aproximadamente el 80%, significa que en un rebaño infectado son necesarios al menos 10 ciclos de diagnóstico para eliminar esta infección (Ralph, 1989). Si en un primer test la prevalencia es alta, o si en la necropsia de los animales sacrificados se encuentran lesiones consideradas abiertas, debe repetirse la prueba en cortos intervalos de tiempo para que la velocidad de diseminación de la infección no supere la tasa de saneamiento. En los rebaños negativos en dos pruebas consecutivas pueden realizarse el test anualmente (Blood et ál, 1989). Los animales sospechosos deben permanecer aislados del resto de rebaño. Debe controlarse cuidadosamente el origen de los animales de reposición, así como otras especies animales de la granja y los cuidadores.

En la erradicación de la tuberculosis intervienen una serie de factores: (1) incidencia de la enfermedad, (2) capacidad económica del país para soportar las pérdidas producidas por un programa de erradicación, (3) sistemas de manejo de los animales, y (4) actitud de la comunidad ganadera (Blood et ál, 1989).

Si la incidencia media de la infección no es muy alta puede llevarse a cabo su erradicación sometiendo de forma obligatoria a todos los animales a la prueba de la

tuberculina, y sacrificando en un breve periodo de tiempo a los positivos. Los servicios de inspección cárnica ofrecen un punto de vigilancia necesario en los estadios finales de un programa de erradicación para detectar y "seguir la pista" a los rebaños infectados.

Cuando la incidencia de la infección es elevada, o si intervienen de forma desfavorable otros factores logísticos o socioeconómicos, un rutinario programa de erradicación basado en el sacrificio de los animales reactivos es inviable. En estos casos, el objetivo principal es el establecimiento de medidas que eviten la transmisión de la infección (Daborn et ál, 1993).

a. Vacunación con *M. bovis* BCG

Los resultados de las pruebas llevadas a cabo en una serie de países del uso extensivo de la vacuna en seres humanos son complejos y contradictorios, oscilando la eficacia protectora (porcentaje de reducción de la tuberculosis clínica atribuible a la vacunación) entre el 0 y el 80%. La vacuna es relativamente efectiva en la prevención de las formas más graves de la enfermedad en la edad infantil, pero su impacto en la reducción de la epidemia general de la infección es mínima (WHO, 1995). Aproximadamente el 80% de los niños han sido vacunados con BCG durante el Programa de Inmunización de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1995). Los fallos de la vacuna se han atribuido a diferencias en las propiedades inmunogénicas de las diferentes cepas de *M. bovis* BCG, la variación geográfica, características genéticas de las poblaciones, calidad de la nutrición, otras infecciones concurrentes, y nivel de exposición a distintas cepas locales de *M. tuberculosis* y a otras micobacterias atípicas (Grange, 1986; Springett et ál, 1994).

Una revisión de los informes publicados sobre la eficacia de la BCG (Colditz et ál, 1994) dedujo que: (1) la vacunación con BCG reduce el riesgo de tuberculosis en un 50%, (2) la protección es principalmente frente a las formas mas severas de la infección (meningitis, enfermedad diseminada y muerte), pero también protege frente a la tuberculosis pulmonar, (3) la edad de vacunación no está relacionada con la eficacia de la BCG, (4) la eficacia de la vacunación con BCG es mayor cuanto más alejado del ecuador, y (5) las diferentes cepas de BCG no están consistentemente asociadas con resultados favorables o desfavorables. Los principales inconvenientes de esta vacuna son la impredecible efectividad

para la mayor parte de la población mundial; que generalmente induce sensibilidad a la tuberculina, reduciendo la utilidad de la prueba como diagnóstico (Anon, 1980); y el riesgo de reactivación de tuberculosis (Springett et ál, 1994).

Varios informes sugieren que la vacunación con *M. bovis* BCG confiere un cierto grado de inmunidad al ganado. En unos experimentos realizados en Reino Unido en los años 40 y 50, el examen *postmortem* de los animales demostró lesiones tuberculosas en el 30% de los animales vacunados, y en el 50% de los no vacunados (Zuckerman, 1980). En las pruebas desarrolladas en Malawi, el ganado vacunado fue más resistente al desarrollo de lesiones que los controles no vacunados, decomisándose el 16,1% y 54,8% de las canales respectivamente (Elwood et ál, 1972; Waddington et ál, 1972). Sin embargo, en las posteriores pruebas de campo para determinar la capacidad de la BCG para reducir la incidencia y diseminación de la infección en el mismo país, no se obtuvieron diferencias en la necropsia y en el examen bacteriológico entre los grupos de animales vacunados y control, no detectándose diferencias ni en la tasa de infección ni en la progresión de las lesiones (Berggren, 1981). La cepa utilizada en Malawi fue la Glaxo, una cepa no productora de MPB70, que podría ser importante en la inducción de inmunidad protectora en el ganado (Foster, 1992).

La vacunación del ganado con BCG no se utiliza no sólo por su bajo efecto protector, sino porque induce la respuesta a la tuberculinización, interfiriendo con los esquemas de erradicación. La reacción máxima se alcanza a las 5 semanas postvacunación, y puede persistir más de 2 años (Moodi, 1977). Además de los inconvenientes inherentes a la administración de la vacuna, una de las condiciones más importantes es la aplicación únicamente en animales libres de la infección (WHO, 1959). Aunque no existe evidencia de que la vacunación de animales infectados exacerbe la enfermedad o induzca la excreción de *M. bovis* (Newell et ál, 1995), es un riesgo para la Salud Pública el mantenimiento de estos animales (Lesslie, 1965). Sin embargo, podría ser de utilidad en países tropicales para controlar, ya que es imposible erradicar, la tuberculosis (Daborn et ál, 1993). Ante la imposibilidad de llevar a cabo la erradicación basada en el sacrificio de los animales infectados, puede ser aplicada en ganado vacuno, caprino, búfalos y camellos en circunstancias en las que exista un riesgo para la población humana, y en animales salvajes que actuando

como reservorios de la infección, planteen una amenaza para el ganado (WHO/FAO/OIE, 1994).

7.2. TUBERCULOSIS EN LA CABRA Y EN LA OVEJA

Las cabras y las ovejas son susceptibles a *M. bovis* y resistentes a la enfermedad progresiva por *M. tuberculosis*. La principal vía de infección es la respiratoria, y las lesiones se encuentran con más frecuencia en el tórax. La bronconeumonía se manifiesta con alteraciones en la respiración y tos, junto con pérdida generalizada de peso y descenso en la producción lechera. La patogenia y las lesiones son similares a las del ganado vacuno (Jubb et ál, 1980; Biberstein et ál, 1990), pudiendo también padecer las diferentes fases de complejo primario, generalización precoz, tuberculosis orgánica crónica y generalización tardía (Bernabé et ál, 1990). En algunos casos existe incremento de tamaño de los ganglios linfáticos del tracto digestivo (Blood et ál, 1989). Las infecciones con *M. bovis* y *M. paratuberculosis* pueden solaparse (Bernabé et ál, 1991).

En países desarrollados, con programas de erradicación de la tuberculosis bovina avanzados, se vigila la infección de *M. bovis* en cabras, ya que éstas son capaces de reinfectar al ganado (Acha et ál, 1987). Las cabras lecheras también pueden padecer mastitis tuberculosa (Soliman et ál, 1953), por lo que su leche constituye un peligro para el consumidor.

Las diferencias de comportamiento del ganado ovino, mucho menos curioso que el vacuno, limitan su exposición a fuentes de contagio. Ocasionalmente se han encontrado prevalencias del 18% en rebaños de Nueva Zelanda (Davidson et ál, 1981). La distribución de las lesiones sugirió la infección por ingestión e inhalación. La apariencia microscópica es la de un granuloma típico con centro caseoso, pero la apariencia macroscópica es la de un absceso con cápsula fina y abundante pus mucoso muy viscoso (Cordes et ál, 1981).

La infección con *M. avium-intracellulare* es rara en cabras y ovejas. Puede originar lesiones en el tracto intestinal y en los ganglios linfáticos mesentéricos, produciendo anorexia y diarrea crónica (Anderson et ál, 1993).

7.3. TUBERCULOSIS EN EL CERDO

El cerdo es susceptible a la infección por *M. bovis*, *M. tuberculosis* y *M. avium-intracellulare*. Aunque en el pasado la infección con *M. bovis* era más común, se considera que *M. avium-intracellulare* es responsable de la mayoría de las lesiones tuberculosas (Feldman et ál, 1940; Lesslie et ál, 1968), aunque la prevalencia de ambas infecciones varía ampliamente según los estudios realizados en diferentes países y años; entre el 11 y el 94 % de los aislamientos son *M. avium*, y entre el 4 y el 34% son *M. bovis* (Elian et ál, 1953; Lafont et ál, 1966; Lesslie et ál, 1968; Kleeberg et ál, 1969). En un estudio realizado en Nueva Zelanda entre 1987 y 1993, el 91% estaba producido por *M. avium-intracellulare* y el 8,9% por *M. bovis* (Lisle, 1994).

El nivel de infección por *M. bovis* en los cerdos es un reflejo de la prevalencia en el ganado, por lo que los programas de erradicación de la tuberculosis bovina reducen la tasa de infección en el ganado porcino (Acha et ál, 1987). La principal ruta de infección es vía oral, debido al consumo de leche y restos de cocina y matadero inadecuadamente tratados (McLaughlin, 1989; de Lisle, 1994). Las lesiones se localizan en los ganglios linfáticos submandibular, faríngeo y mesentéricos (Gardner et ál, 1989; Lisle, 1994). La tuberculosis generalizada suele estar producida por *M. bovis*, pero también se han encontrado casos de enfermedad progresiva debida a *M. avium* (Lesslie et ál, 1968).

M. bovis produce tubérculos caseocalcificados rodeados de una cápsula fibrosa, similares a los del ganado vacuno. La tuberculosis pulmonar es de origen hematógeno y suele ser miliar. En algunos casos, la confluencia de numerosos tubérculos asemeja el aspecto de una bronconeumonía caseosa. Hígado, bazo, meninges, esqueleto, piel y ojos pueden verse también afectados (Jubb et ál, 1980). Los casos generalizados asemejan a los vistos en el vacuno, pero las articulaciones y las serosas están afectadas más frecuentemente (Blood et ál, 1989).

La transmisión de *M. bovis* entre cerdos, y entre cerdos y otros animales, no se considera significativamente importante desde un punto de vista epidemiológico, ya que

normalmente son sacrificados muy jóvenes (O'Reilly et ál, 1995).

7.3.1. Infección por *M. tuberculosis* y el complejo *M. avium-intracellulare*

La infección por *M. tuberculosis* produce generalmente lesiones pequeñas y localizadas en los ganglios linfáticos de entrada, en áreas con alta incidencia de tuberculosis en humanos (Kleeberg et ál, 1969). Fue excepcionalmente elevada en Sudáfrica (5,8%) y Egipto (60%) (Elian et ál, 1953; Kleeberg et ál, 1969).

La tuberculosis por microorganismos del complejo MAIS puede estar producida por las serovariedades 1, 2, 4, 6, 8, 9 y 10 (Gardner et ál, 1989; Lisle, 1994). Inicialmente los serotipos 1 y 2 producían el 75% de la tuberculosis aviar porcina (Thoen et ál, 1975). Posteriormente se han encontrado altos niveles de infección con los serotipos 4 y 8 (Pritchard et ál, 1977; Hird et ál, 1983). La infección por *M. avium* está relacionada con la prevalencia de esta enfermedad en las aves (Feldman et ál, 1940), así como con la exposición continuada a una fuente ambiental de contaminación, suelo, serrín o agua (Gardner et ál, 1989), ya que estos microorganismos son muy resistentes a las condiciones ambientales. *M. avium* origina lesiones de naturaleza proliferativa, con tejido de granulación (Jubb et ál, 1980). No se ha detectado evidencia de transmisión entre animales, aunque los microorganismos pueden eliminarse en heces (Gardner et ál, 1989).

La localización de las lesiones producidas por las distintas especies de micobacterias son idénticas, y éstas no pueden ser diferenciadas ni macroscópica ni histológicamente, siendo necesario el cultivo de las lesiones y la identificación de las colonias (Kleeberg et al., 1969; de Lisle, 1994). Aproximadamente la mitad de las lesiones tuberculosas están en realidad producidas por otras bacterias, especialmente *Rhodococcus* (*Corynebacterium*) *equi* (Feldman et ál, 1940; Lesslie et ál, 1968; Barton et ál, 1980).

La prueba de la tuberculinización intradérmica puede utilizarse para el diagnóstico *antemorten*. La base de la oreja es el mejor punto para su realización. La utilización de la prueba comparativa con tuberculinas bovina y aviar es necesaria (de Lisle, 1994).

7.4. TUBERCULOSIS EN CABALLOS, ASNOS Y MULAS

Los équidos son susceptibles a la infección por *M. bovis* y *M. tuberculosis* (Stableforth, 1929; Kesten, 1949; Francis, 1958). En una revisión de la literatura, el 92% de los casos estaba producido por *M. bovis*, el 6,7% por *M. avium* y el 1,3% por *M. tuberculosis* (Lovell et ál, 1941). Una de las características más sobresalientes de la tuberculosis en el caballo es la frecuencia con la que las lesiones, excepto la tuberculosis miliar, tienen aspecto lardáceo gris uniforme y apariencia de sarcomas (Francis, 1958; Jubb et ál, 1980; Blood et ál, 1989). Histológicamente, la lesión consta de mononucleares, células epitelioides y células gigantes, sin una zona periférica de linfocitos (Jubb et ál, 1980). Al progresar la lesión aumenta la cantidad de tejido conectivo fibroso en el que aparecen dispersos unos cuantos tubérculos mal definidos. El complejo primario suele ser incompleto, con grandes lesiones en los ganglios linfáticos mesentéricos o retrofaríngeos, pero sin un foco inicial manifiesto. En algunos casos existen úlceras en el intestino, más frecuentemente en el grueso. Las vértebras cervicales pueden estar afectadas produciendo una osteomielitis dolorosa y rigidez (Blood et ál, 1989). Se han descrito lesiones en pulmones, bazo, serosas, mamas y piel debidas a una generalización. La tuberculosis pulmonar es generalmente miliar, y la hepática y esplénica son nodulares (Jubb et ál, 1980). Esta infección carece de significado epidemiológico (Francis, 1958).

7.5. TUBERCULOSIS EN PERROS Y GATOS

Desde la primera descripción de infección natural por micobacterias en perros (Blaine, 1913) se han descrito numerosas especies de bacterias del género *Mycobacterium* como productoras de enfermedad en perros y gatos (Tabla I.14). *M. tuberculosis* y *M. bovis*, agentes etiológicos de la tuberculosis en estos animales, son los más importantes tanto por su repercusión en la salud humana como por la gravedad del cuadro que originan.

Existe además un nutrido grupo de micobacterias atípicas que pueden comportarse como patógenas oportunistas que pueden ser adquiridas por la exposición a suelos, agua o tejidos de animales infectados, adquiridos vía percutánea, respiratoria o digestiva. La mayoría

de estas bacterias son débilmente patógenas y su localización en tejidos internos implica un deterioro del sistema inmune. Producen generalmente granulomas cutáneos o subcutáneos, involucrando a veces a los ganglios linfáticos regionales (Parodi et ál, 1965). Las lesiones son macroscópica e histológicamente idénticas a las producidas por los organismos del complejo *M. tuberculosis*. Los animales pueden desarrollar reacciones positivas a la prueba de la tuberculina o a la BCG (Greene, 1984). El número de informes sobre infecciones por micobacterias atípicas se ha incrementado en los últimos años.

Tabla I.14. Especies del género *Mycobacterium* que pueden encontrarse como productoras de enfermedad en perros y gatos.

Especie	Hospedador natural	Enfermedad
<i>M. tuberculosis</i>	perro y gato	tuberculosis
<i>M. bovis</i>	perro y gato	tuberculosis
<i>M. lepraemurium</i>	gato	lepra felina
<i>M. avium-intracellulare</i>	perro y gato	micobacteriosis diseminada micobacteriosis cutánea
<i>M. xenopi</i>	gato	micobacteriosis cutánea
<i>M. chelonae</i>	perro	micobacteriosis cutánea
<i>M. fortuitum</i>	perro y gato	micobacteriosis cutánea
<i>M. phlei</i>	gato	micobacteriosis cutánea
<i>M. smegmatis</i>	gato	micobacteriosis cutánea
<i>M. thermoresistibile</i>	gato	micobacteriosis cutánea

7.5.1. Epizootiología

La tuberculosis canina y felina puede ser considerada una antropozoonosis, ya que la dirección de la transmisión conocida es del hombre al animal; éstos pueden infectarse al vivir en íntima asociación con seres humanos que padezcan esta enfermedad (Snider, 1971). Aunque no se ha demostrado la diseminación de la enfermedad del animal al hombre (Greene, 1984) no cabe duda que, dependiendo de la localización de la infección en el sistema respiratorio, en el tracto gastrointestinal o en el renal, los animales pueden descargar bacilos en el esputo y aerosoles, o eliminar bacilos en las heces o en la orina, al igual que lo hacen

las personas infectadas (Greene, 1984).

La tuberculosis en los pequeños animales es a menudo un marcador precoz de la enfermedad en las personas (Jarret et ál, 1957; Bornet, 1982) por lo que es esencial un diagnóstico precoz que permita trazar el origen de la infección y contribuir a la erradicación de la enfermedad (Clercx et ál, 1992). Aunque *M. tuberculosis* y *M. bovis* son las micobacterias más patógenas, existen otras micobacterias asociadas a enfermedades, por lo que es necesaria la determinación rápida de la etiología específica de las lesiones nódulares inflamatorias crónicas que contengan bacilos ácido-alcohol resistentes en éstos animales (Clercx et ál, 1992). En un estudio realizado en Glasgow en 1957, se observó que el 35% de las personas en contacto con perros tuberculosos tenían tuberculosis, en algunas no diagnosticada previamente, y un 10% de animales aparentemente sanos, pertenecientes a personas con esputo positivo fueron también cultivo positivo (Hawthorne et ál, 1957). En otro estudio similar, de 8 perros tuberculosos, 7 vivían o estaban en relación con personas que habían padecido la enfermedad (Liu et ál, 1980).

Perros y gatos pueden ser reservorios y diseminadores potenciales de la tuberculosis bovina, pudiendo estar involucrados en el mantenimiento de esta infección en las granjas, ya que los animales infectados subclínicamente permanecen en éstas después de la detección y posterior eliminación del ganado reactor (Snider et ál, 1970).

La tuberculosis es una enfermedad de curso generalmente crónico, diagnosticada con escasa frecuencia en el perro y en el gato. Su incidencia global en animales necropsiados varía según los distintos estudios; 4,5% (Hawthorne et ál, 1957), 0,3% (Caniatti et ál, 1987) y 0,05% (Liu et ál, 1980) de necropsias caninas; y en el 2,3% de las felinas (Caniatti et ál, 1987).

El perro es igualmente sensible a *M. tuberculosis* y a *M. bovis*; sin embargo, aproximadamente el 75% de los casos de tuberculosis en el perro están producidos por *M. tuberculosis*, siendo atribuído este mayor porcentaje a la exposición a personas portadoras (Goret et ál, 1971; Snider et ál, 1975). Según las investigaciones de otros autores, el 65,7%

de las tuberculosis caninas son debidas a *M. tuberculosis* y el 34% a *M. bovis* (Séculi et ál, 1976). Para algunos autores los gatos son más susceptibles a *M. bovis* que a *M. tuberculosis*, (Hix et ál, 1961; Orr et ál, 1980) o bien son resistentes a éste último (Jubb et ál, 1980). El 95% de estos casos son debidos a *M. bovis* y el 4,6% a *M. tuberculosis* (Séculi et ál, 1976). Parte de la afinidad entre los gatos y *M. bovis* está relacionada con la frecuente ingestión de leche contaminada y no pasteurizada proveniente de vacas infectadas. La leche es un vehículo perfecto de infección debido a su efecto tampón sobre el ácido gástrico, que normalmente evita la colonización del tracto intestinal. La infección puede también ser adquirida con la ingestión de vísceras contaminadas (Isaac et ál, 1983; Clercx et ál, 1992). La transmisión de la tuberculosis del propietario a su gato parece excepcional (Hillerdal et ál, 1981).

Los perros y los gatos son relativamente resistentes a *M. avium* (Tabla I.15), aunque existen referencias de infecciones naturales.

Tabla I.15. Susceptibilidad relativa de perro, gatos y hombre frente a *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium*.

Micobacteria	Perros	Gatos	Seres humanos
<i>M. tuberculosis</i>	muy susceptibles	susceptibles	muy susceptibles
<i>M. bovis</i>	muy susceptibles	muy susceptibles	muy susceptibles
<i>M. avium</i>	susceptibles	susceptibles	susceptibles

7.5.2. Patogénesis

Las localizaciones primarias de *M. tuberculosis* son más frecuentemente torácicas y cutáneas (Parodi et ál, 1965). *M. bovis* es generalmente responsable de lesiones primarias en el tracto digestivo que pueden estar seguidas de una generalización rápida, y raramente provoca lesiones respiratorias primarias y cutáneas (de Lisle et ál, 1990). Los bacilos ingresan en el organismo vía respiratoria, por inhalación de aerosoles contaminados (principalmente en perros), o digestiva, por la ingestión de alimentos contaminados (principalmente en gatos). Los perros tienden a desarrollar infecciones respiratorias con formación de complejos primarios completos. Los gatos desarrollan comúnmente complejos primarios incompletos (localización en el ganglio linfático sin formación de lesión en el lugar de depósito), afectando

fundamentalmente a los ganglios linfáticos retrofaríngeos e ileocecales. Sin embargo, en un estudio realizado entre 1962 y 1986, de 14 perros y 28 gatos tuberculosos, 5 (35,7%) y 4 (14,3%) respectivamente mostraban sólo lesiones abdominales; 8 perros (57,1%) y 18 gatos (64,3%) tenían tanto tórax como abdomen afectados, y únicamente 1 perro (7,1%) y 6 gatos (21,4%) mostraban lesiones exclusivamente en tórax (Caniatti et ál, 1987).

La inmunidad es incompleta en la mayoría de los casos, y estos microorganismos persisten largos periodos en los granulomas encapsulados, pudiendo diseminarse después como consecuencia de una inmunosupresión. La reactivación de la infección tuberculosa puede ocurrir en perros y gatos tras periodos de quiescencia (Parodi et ál, 1965).

7.5.3. Sintomatología

La tuberculosis canina y felina es una enfermedad a menudo subclínica. Estos animales pueden no presentar síntomas durante largos periodos de tiempo, aunque tengan lesiones activas y abiertas. Los signos, una vez aparecidos, son poco característicos (Liu et ál, 1980; Clercx et ál, 1992), poco acusados y de progresión generalmente lenta: apetito decreciente, fatiga y debilidad, fiebre, trastornos digestivos y emaciación. Los animales son tratados repetidamente para solucionar esta sintomatología, pero sin éxito. Posteriormente, aparecen los síntomas que reflejan la localización del complejo primario, encontrándose más frecuentemente los cuadros pulmonar, intestinal y orofaríngeo.

a. Cuadro pulmonar

Más frecuente en perros, está caracterizado por bronconeumonía, formación de nódulos pulmonares y linfadenopatías bronquiomediastínicas que producen fiebre, pérdida de peso, anorexia, tos crónica, dolorosa, improductiva o con secreción mucopurulenta que es deglutida. La respiración se va haciendo más laboriosa, taquipneica y se aprecian estertores y a la percusión, áreas de macicez. Puede producirse neumotórax y piotórax a consecuencia de una rotura de la pleura, o bien adherencias pulmonares y el desarrollo de una inflamación de la pleura y del pericardio.

b. Cuadro intestinal

Más frecuente en gatos, produce trastornos de la nutrición: pérdida de peso, anemia, vómitos y catarro intestinal crónico al principio, después diarrea, signos de mala absorción intestinal, ganglios mesentéricos hipertróficos y efusión abdominal en algunos casos. Existe dolor al presionar las vísceras abdominales afectadas, hipertrofia hepática y peritonitis generalizada.

c. Cuadro orofaríngeo

Más esporádico que los anteriores, el incremento de volumen de los ganglios linfáticos retrofaríngeos origina arcadas, disfagia, hypersalivación, y alteraciones en el ladrido o maullido.

La sintomatología producida por la diseminación de la infección puede ser el primer signo de la enfermedad que aparece en muchos perros y gatos, y dependerá de los órganos afectados. Puede producir una sintomatología común en ambas especies; efusión pleural y pericárdica con disnea, cianosis y fallo cardíaco si existe extensión pulmonar. Se observa linfadenopatía generalizada, pérdida de peso y fiebre. Puede haber hemopstisis, hematuria e ictericia. Existen masas en órganos abdominales, como hígado, bazo y riñón.

En gatos pueden verse lesiones dérmicas consistentes en nódulos, abscesos subcutáneos y úlceras drenantes que no cicatrizan. En perros, la forma cutánea suele ser un nódulo linfático granulomatoso que conecta con la superficie por medio de un conducto. Las localizaciones más comunes son la región submandibular (Foster et ál, 1986) y las extremidades (White, 1986). A diferencia de la lepra felina y las micobacteriosis cutáneas por atípicas, estos animales presentan signos sistémicos.

Otras localizaciones menos frecuentes son el globo ocular (uveitis granulomatosa) (Crispin, 1987), afecciones del sistema nervioso central (Greene, 1984), útero, ovarios, testículos, huesos y articulaciones (cojeras y fracturas espontáneas) (Séculi et ál, 1975). Como secuela de la enfermedad en el perro puede existir un engrosamiento difuso en los huesos largos, casi siempre de las cuatro extremidades, debido a una periostitis osificante dolorosa,

diagnosticable por radioscopia y denominada acropaquia o enfermedad de Marie (Séculi et ál, 1975).

7.5.4. Hallazgos anatomopatológicos

a. Lesiones macroscópicas

La emaciación es frecuente. En varios órganos aparecen granulomas multifocales blancogrisáceos o amarillos. Los focos primarios de los pulmones se desarrollan, casi siempre, en la porción dorsal de los lóbulos diafragmáticos; aparecen como nódulos lardáceos o sarcomatosos de 1 a 3 centímetros de diámetro. La diseminación dentro de los pulmones es rápida y produce bronquitis, bronquiolitis y neumonía peribronquial. La tuberculosis pulmonar difusa, una forma exudativa relativamente rara, es más frecuente en los carnívoros que en otras especies (Ghorbel et ál, 1989). La destrucción de las paredes bronquiales por el tejido de granulación permite, cuando existe licuefacción, la evacuación del exudado dejando cavernas. Si la licuefacción se fistuliza puede alcanzar la pleura, produciendo pleuritis serofibrinosa, uni o bilateral. La pleura aparece engrosada en placas, o de forma difusa por un tejido de granulación inespecífico. En la cavidad pleural se acumulan grandes cantidades de un exudado serofibrinoso (cuando el fluido es lechoso con alto contenido celular y bacteriano, o seroso con escasas células) o sanguinolento.

La diseminación generalizada es más común en perros que en gatos, afectando fundamentalmente a ganglios linfáticos, pleura, pericardio, corazón, hígado, riñón, intestino y sistema nervioso central en caso de los primeros, y a los ganglios linfáticos mesentéricos, hígado, bazo, peritoneo (peritonitis exudativa con nódulos de tejido de granulación) y piel en caso de los segundos, aunque también puede producir tuberculosis miliar aguda del pulmón, bronconeumonía caseosa, pleuresía y pericarditis. Las lesiones por metástasis son frecuentemente pequeñas (de 1 a 3 milímetros), aunque puede haber lesiones mayores y coalescentes (Greene, 1984).

b. Lesiones microscópicas

Las lesiones de la tuberculosis en los carnívoros son diferentes de las de otras especies

animales y más parecen lesiones sarcomatosas que los típicos granulomas tuberculosos (Anderson, 1971), porque las lesiones se componen de un tejido de granulación inespecífico (Jubb et ál, 1980) como consecuencia de la reacción proliferativa y exudativa provocada por los microorganismos. Histológicamente, las lesiones granulomatosas son áreas de necrosis focal rodeadas de infiltración de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. La encapsulación consiste en densas capas periféricas de fibroblastos formando un fino tejido conectivo fibroso. Las células epitelioides o histiocitos delimitan normalmente la zona necrótica y no se observa la formación de células gigantes, común en otras especies (Greene, 1984). La caseificación es más frecuente en el gato, en especial en los nódulos del hígado, riñón y mesenterio. A veces existe calcificación del granuloma, sin embargo, la licuefacción de la zona central necrótica, según los autores, es muy rara en los carnívoros (Greene, 1984) o frecuente, tanto en los nódulos de órganos como en ganglios linfáticos (Jubb et ál, 1980). En la periferia de las lesiones necróticas se puede detectar un escaso número de bacilos intracelulares ácido-alcohol resistentes. En algunos animales puede encontrarse amiloidosis renal, asociada a enfermedades inflamatorias crónicas. La excreción de fosfato está reducida y el incremento de fosfato sérico puede ocasionar hiperparotiroidismo secundario.

7.5.5. Diagnóstico

a. Diagnóstico clínico

Ya que el cuadro clínico no es característico, ni la enfermedad frecuente, el diagnóstico *in vivo* es difícil, por lo que a menudo evoluciona sin ser identificada (Séculi et ál, 1976). Los problemas respiratorios crónicos, el empeoramiento progresivo, la emaciación, etc... pueden hacer sospechar la tuberculosis. Los hallazgos hematológicos son inespecíficos; leucocitosis moderada, anemia e hiperglobulinemia (Liu et ál, 1980). En el estudio radiográfico pueden observarse las linfadenopatías traqueobronquiales y mesentéricas, la infiltración pulmonar intersticial y los granulomas, así como la hipertrofia de órganos abdominales parenquimatosos o las masas abdominales aisladas; pero los resultados dependen de la extensión de la infección, y las imágenes no son específicas y pueden ser confundidas con neoplasias (Liu et ál, 1980). Las lesiones por metástasis aparecen como zonas de distribución miliar densas difusas. Las lesiones óseas son osteomielitis vertebral y

osteoartrópata.

La intradermotuberculinización carece de valor diagnóstico en estos animales. Los gatos, a diferencia de otras especies, no reaccionan a la tuberculina administrada intradérmicamente (Legendre et ál, 1977). La prueba subcutánea con tuberculina tampoco es válida (Snider, 1971). Sin embargo, los perros y gatos sensibilizados con BCG responden a la inoculación intradérmica de tuberculina (Thilsted et ál, 1978; Pedersen, 1982). Los perros infectados responden a la prueba intradérmica (Wieselthaler, 1975) realizada en la cara interior de la extremidad posterior o en la superficie interna de la pinna. Sin embargo, existen numerosas reacciones falsamente positivas debido a reacciones cruzadas con otras especies de micobacterias. En general, con la prueba intradérmica se obtienen resultados de poca confianza en los pequeños animales, tanto de falsos negativos como positivos (Clercx et ál, 1992). La utilización de BCG es ligeramente más sensible que la PPD. La evaluación de la elevación de la temperatura tras la inoculación de tuberculina suele ser imposible debido a la fiebre existente (Foster et ál, 1986; Ghorbel et ál, 1989). En perros y gatos existe una marcada disociación entre la reacción a la prueba dérmica y las reacciones mediadas por células frente a la tuberculina realizadas *in vitro* (Guelfi et ál, 1977; Legendre et ál, 1977). La prueba *in vitro* de la estimulación de linfocitos con tuberculina obtuvo resultados inconsistentes (Guelfi et ál, 1977; Legendre et ál, 1977).

b. Diagnóstico anatomopatológico y microbiológico

El diagnóstico macroscópico no es en absoluto concluyente, ya que las lesiones pueden ser confundidas con procesos tumorales, especialmente linfosarcomas y bronconeumonías granulomatosas de origen viral (peritonitis infecciosa felina), parasitario (dirofilariosis, aelurostrongiliosis, toxoplasmosis), bacteriano (nocardiosis) y micótico (histoplasma), silicosis, pericarditis y pleuritis sépticas, lesiones cutáneas ulcerosas de la piel en los gatos, y reacción por cuerpo extraño, así como otras linfaadenitis bacterianas y fúngicas en perros. El estudio histológico de las lesiones es más rápido que el cultivo, pero no ofrece información sobre el agente causante de la enfermedad (Hawthorne et ál, 1957).

Para el diagnóstico definitivo es necesario poner en evidencia la presencia de bacilos

ácido-alcohol resistentes en biopsias, exudados pleurales, esputo u orina; pero la dificultad de encontrar éstos, así como la baja sensibilidad y la falta de especificidad de las tinciones, obligan a que la identificación del microorganismo en las secreciones o biopsias sea mediante cultivo.

7.5.6. Terapia

Aunque existe un informe de tratamiento con éxito de la tuberculosis en perros (Snider, 1971), la decisión del mantenimiento y tratamiento de perros y gatos infectados debe hacerse cuidadosamente, debido al riesgo que supone la tuberculosis activa para la salud humana (Greene, 1984) y el desconocimiento de la combinación de fármacos apropiada, dosis, duración del tratamiento y el resultado a largo plazo. Cuando se diagnostica la tuberculosis suele ser en casos avanzados y abiertos y el pronóstico es desfavorable, por lo que algunos autores aconsejan la eutanasia (Hawthorne et ál, 1957; Séculi et ál, 1976). A falta de una prueba diagnóstica para comprobar la exposición o latencia de la enfermedad, puede recomendarse que los animales expuestos a la tuberculosis bovina o humana sean tratados quimioprolácticamente. La vacunación confiere solamente inmunidad parcial y no está recomendada.

7.5.7. Infección por *M. avium*

La enfermedad ocasionada por *M. avium-M. intracellulare* es considerada bastante rara en perros y gatos dada su resistencia natural a este microorganismo (Thoen et ál, 1981; Greene, 1984; Thorel et ál, 1990). *M. avium* produce el 0,3% de las enfermedades diseminadas producidas por micobacterias en el perro y el 0,4% en el gato (Séculi et ál, 1976). La mayor parte de los casos se han observado en perros Basset Hounds y en gatos siameses, indicando un posible defecto genético o adquirido en la regulación o en el desarrollo de la respuesta inmune efectiva frente a este agente (Farhi et ál, 1986), afectando a las células T o a la capacidad de eliminar bacterias intracelulares, ya que aparece un alto número de bacilos en el interior de los macrófagos (Carpenter et ál, 1988). Algunos gatos siameses presentan una predisposición a infecciones con patógenos intracelulares. A diferencia

del hombre cuando está afectado con el virus de la inmunodeficiencia adquirida, la micobacteriosis secundaria no es común en las infecciones con retrovirus felinos (Ishida et ál, 1989).

M. avium se aísla con relativa frecuencia de muestras ambientales (Grange et ál, 1990), y la infección puede adquirirse por la ingestión de carne de animales infectados o por contacto con el suelo u objetos contaminados (Friend et ál, 1979; Thoen et ál, 1981). En cualquier caso, cuando la enfermedad cursa con extensas lesiones intestinales puede pensarse en una ruta oral, con diseminación hematógica y linfática (Shackelford et ál, 1989).

Los signos y síntomas generales incluyen anorexia, anemia, pérdida de peso, fiebre, letargia, vómitos, diarrea, linfadenopatía generalizada y debilidad de las extremidades. En la necropsia de los animales suele observarse linfadenitis granulomatosa, neumonía intersticial difusa, hepatitis multifocal necrotizante, hemorragias intersticiales e infartos en riñón (Drolet, 1986), esplenitis granulomatosa, enterocolitis (Jordan et ál, 1994) y osteomielitis (Carpenter et ál, 1988; Shackelford et ál, 1989; Kim et ál, 1994). Existen descripciones de lesiones cutáneas producidas por *M. avium*; dermatitis histiocítica difusa crónica (Stewart et ál, 1994) y granulomas (Suter et ál, 1984).

Histológicamente las lesiones aparecen como un granuloma atípico, vascularizado, con escasas células plasmáticas y carente de células gigantes tipo Langhans. Presenta amplias zonas de necrosis caseosa, ausencia de calcificación y bacilos intracelulares ácido-alcohol resistentes (Novoa et ál, 1986; Carpenter et ál, 1988).

Los serotipos aislados más frecuentemente en animales son el 1 y el 2 (Thoen, 1981). En perros y gatos se han encontrado los serotipos 1, 2 y 4 de *M. avium* (Jordan et ál, 1994). El tratamiento de estas infecciones es difícil, ya que son resistentes a la mayoría de los medicamentos antituberculosos (Inderlied et ál, 1993). La administración de isoniazida, etambutol, estreptomina, rifampicina, kanamicina y pirazinamida no ha tenido éxito (Carpenter et ál, 1988), pero existen algunas referencias indicando respuesta a tratamientos de 4 a 6 semanas con tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfonamida, lincomicina,

etambutol e isoniazida (White et ál, 1983). En general el pronóstico de la micobacteriosis por *M. avium* diseminada es desfavorable. Aunque no existen informes de la transmisión de este microorganismo de los animales a las personas, estas infecciones deben tratarse como zoonosis potenciales, particularmente para individuos inmunocomprometidos (Jordan et ál, 1994). Por estos motivos algunos autores aconsejan la eutanasia (Zeiss et ál, 1994).

7.5.8. Infecciones por otras micobacterias

Se pueden diferenciar dos enfermedades independientes respecto a los agentes etiológicos, localización y características de las lesiones y animales afectados: la lepra felina y la micobacteriosis cutánea causada por micobacterias MOTT.

a. Lepra felina

La lepra felina (Lawrence et ál, 1963; Schiefer et ál, 1974; McIntosh, 1982), o granuloma no tuberculoso, consiste en nódulos granulomatosos y lesiones frecuentemente ulceradas de la piel y del tejido subcutáneo. Los nódulos dérmicos únicos o multiples, son generalmente indoloros y se localizan principalmente en la cabeza y en las extremidades. Los gatos no presentan signos de enfermedad generalizada. Se cree que la transmisión de la enfermedad ocurre por mordedura a roedores infectados. El organismo asociado a estos granulomas es *M. lepraemurium*, el agente causal de la lepra murina. Es difícil de cultivar, tarda en crecer de 3 a 8 semanas en el medio Ogawa (Pattyn et ál, 1980).

Las lesiones granulomatosas son relativamente inespecíficas. En la observación de casos de lepra felina suele verse un gran número de bacterias ácidoalcohol resistentes, pero el hallazgo de micobacterias en la tinción no las incrimina en la enfermedad, ya que existen micobacterias saprofitas. El examen histológico de las lesiones de lepra felina revela una amplia inflamación granulomatosa de la piel, del tejido subcutáneo y de los nervios adyacentes, con microorganismos densamente empaquetados en células epitelioides y áreas de necrosis, hallazgo semejante al observado en lepra humana y murina (White et ál, 1983), o bien macrófagos con células gigantes multinucleadas (White, 1986).

b. Micobacteriosis cutáneas por micobacterias MOTT

Este tipo de infecciones están producidas generalmente por micobacterias MOTT, siendo los gatos más sensibles. Los perros pueden desarrollar granulomas parecidos a los de la lepra felina, también sin enfermedad generalizada, pero los organismos aislados de las lesiones son *M. chelonae*, *M. fortuitum* y otras micobacterias atípicas (Gross et ál, 1983).

La paniculitis piogranulomatosa de los gatos afecta principalmente al tejido subcutáneo de las regiones abdominal e inguinal. Se ha asociado a micobacterias de los grupos III y IV de Runyon, tras contaminación de heridas con materia del suelo. Existen descripciones de micobacteriosis cutáneas producidas por *M. fortuitum* (Dewevre et ál, 1977; Wilkinson et ál, 1978), *M. smegmatis* (Wilkinson et ál, 1982), *M. chelonae* (Thorel et ál, 1974), *M. xenopi* (Tomasovic et ál, 1976), *M. phlei* (White et ál, 1983) y *M. thermoresistibile* (Willemse et ál, 1985). *M. smegmatis* suele afectar al tejido adiposo subcutáneo, mientras que otras afectan a la dermis y al tejido subcutáneo (Wilkinson et ál, 1982). Las masas granulomatosas, con o sin tractos fistulosos, drenan periódicamente un exudado acuoso o purulento. El tejido subcutáneo se encuentra engrosado y adherido a las capas profundas. Las lesiones van interesando un área cada vez mayor, y a menudo aparece linfadenopatía superficial. También suelen ser indoloras y no producen signos de enfermedad. Raramente se diseminan a tejidos internos, pero los tratamientos largos con glucocorticoides u otras formas de inmunosupresión pueden predisponer a la diseminación de la infección (Grossman, 1983).

En la tinción específica para micobacterias solamente se observa un escaso número de micobacterias (White, 1986). En el examen histológico de las micobacteriosis cutáneas producidas por las otras micobacterias se aprecia una inflamación piogranulomatosa, a menudo con áreas de necrosis caseosa. El cultivo es el único método para distinguir estas enfermedades. El diagnóstico diferencial debe incluir neoplasias, infecciones fúngicas o bacterianas y granuloma por cuerpo extraño.

Las micobacterias atípicas apenas responden al tratamiento con antibióticos, excepto algunas micobacterias que son sensibles *in vitro* a la rifapentina (análogo sintético a la rifampicina), a la amikamicina (Kunkle et ál, 1983) y a las fluoroquinolonas: enrofloxacin

(White et ál, 1991; Studdert et ál, 1992) y ciprofloxacina (Malik et ál, 1994). Estos granulomas deben ser eliminados quirúrgicamente. Para el tratamiento de la lepra felina se ha utilizado, con éxito variable, dapsona, el mismo agente que se utiliza para la humana, pero produce anemia hemolítica y neurotoxicidad (Allan et ál, 1976). En ocasiones puede existir remisión espontánea (White, 1986).

7.6. TUBERCULOSIS EN CAMÉLIDOS

A principios de siglo el 2,9% de los dromedarios (*Camelus dromedarius*) sacrificados en Egipto padecían tuberculosis por *M. bovis*, probablemente asociada a un estrecho contacto con ganado. La ruta de infección era la vía respiratoria, y el 60% de las lesiones estaban localizadas en el pulmón y en los ganglios linfáticos bronquiales. La tuberculosis generalizada afectó al 7% de los animales estudiados (Mason, 1917). La incidencia de la infección es más elevada en los animales mantenidos junto al ganado bovino (4%) que en los dromedarios de los beduínos (0,025%) (El-Mossalami et ál, 1983).

La tuberculosis por *M. bovis* ha sido también descrita en el camello bactriano (*Camelus bactrianus*) (Bush et ál, 1990). Las lesiones que presentaron estos animales eran sarcomatoides, e histológicamente formaban piogranulomas sólidos, con escasas células gigantes y pocos bacilos ácido-alcohol resistentes (Bush et ál, 1990). La infección por *M. bovis* ha sido igualmente confirmada en la llama (*Llama glama*) (Bleem et ál, 1993) y en la alpaca (Anon, 1989).

La sensibilidad y especificidad de la prueba de la intradermorreacción a la tuberculina en los camélidos es inferior al 50% (Bush et ál, 1990; Bleem et ál, 1993).

7.7. TUBERCULOSIS EN CIERVOS

La tuberculosis producida por *M. bovis* se ha encontrado en todas las especies de ciervos estudiadas. Existen poblaciones de ciervos salvajes con *M. bovis* endémico, probablemente infectadas por contacto con animales domésticos, en Nueva Zelanda, Reino

Unido, Irlanda, Hungría y Estados Unidos de América (Levine, 1934; Belli, 1962; Wilson et ál, 1976; Dodd, 1984; de Lisle, 1985; Tessaro, 1986; Rose, 1987; Kormendy, 1992; Wagner, 1993).

Desde 1930 hasta la actualidad existen informes de infección por *M. bovis* en el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) (Levine, 1934), ciervo mula (*O. hemionus*) (Hadwen, 1942), alce (*Alces alces*) (Hadwen, 1942; Hülphers et ál, 1947), reno (*Rangifer tarandus*) (Lovel, 1930), corzo (*Capreolus capreolus*) (Gunning, 1985; Rose, 1987), gamo (*Dama dama*) (Wilson et ál, 1976; Fleetwood et ál, 1988) ciervo moteado (*Axis axis*) (Sawa et ál, 1974), ciervo sika (*Cervus nippon*) (Dodd, 1984; Mirsky et ál, 1992) y ciervo rojo o común (*Cervus elaphus*) (Dodd, 1984; Beatson, 1985). La tuberculosis causada por *M. tuberculosis* ha sido descrita en parques zoológicos (Jones et ál, 1976; Shah et ál, 1986).

No se conoce la incidencia y mortalidad exacta de esta infección en los animales salvajes y se calcula, por informes de estudios realizados en diferentes países, que a nivel internacional la prevalencia de *M. bovis* en ciervos salvajes alcanza 5,6 % (Hawden, 1942; Bouvier et ál, 1957; Dodd, 1984; Rose, 1987). Sin embargo, generalmente sólo son estudiadas las muestras con lesiones macroscópicas, por lo que la prevalencia de la infección podría ser superior (Clifton-Hadley et ál, 1991). No se puede afirmar con certeza si la infección es endémica en las poblaciones de ciervos o si son brotes esporádicos debido a contactos con otros animales, domésticos o salvajes, infectados (Clifton-Hadley et ál, 1991).

Puesto que precisar la prevalencia de la infección en ciervos salvajes es difícil, el riesgo que suponen para otras especies es desconocido (Tessaro, 1986). Sin embargo, zorros y tejones pueden infectarse por ingestión de animales muertos (Bouvier, 1960) y pueden ser el origen de la infección en ganado y en possums en algunas áreas (Carter, 1988). Se considera que los animales infectados en parques y zoos representan un riesgo documentado para los seres humanos y otros animales (Towar et ál, 1965; Basak et ál, 1975; Stumpff, 1982; Fanning et ál, 1991).

Esta enfermedad reviste especial importancia en las explotaciones de ciervos,

numerosas en algunos países como Nueva Zelanda, con 1,2 millones de cabezas. La expansión de esta industria y la mejora de este ganado ha propiciado los movimientos entre granjas y entre distintos países. En una especie no todavía plenamente domesticada, el estrés provocado por el manejo y la inadecuada nutrición en determinadas épocas del año pueden comprometer la inmunidad de los animales, incrementando la susceptibilidad a esta infección (Griffin, 1987). La fuente más probable de infección para los ciervos en granjas son los ciervos infectados, a pesar de respetar los períodos de cuarentena y los resultados negativos a la intradermotuberculinización (Stuart et ál, 1988). Otras fuentes de infección probables incluyen el ganado bovino, otros ciervos salvajes y tejones.

No todas las especies de ciervos presentan la misma susceptibilidad a la infección por *M. bovis*. El clima, la edad y factores de manejo en el caso de los animales mantenidos en granjas (transporte, nutrición, densidad de población) pueden también influir en esta variabilidad. Los animales jóvenes son particularmente susceptibles a la infección, y los animales menores de seis meses pueden contener altos niveles de infección sin evidencias patológicas de enfermedad y sin reaccionar a las pruebas diagnósticas, ya que carecen de la respuesta inmunitaria característica de los adultos (Griffin et ál, 1989).

7.7.1. Sintomatología y lesiones

La tuberculosis producida por *M. bovis* es una enfermedad subaguda o crónica. Los síntomas clínicos dependen de la distribución de las lesiones. Esta enfermedad se manifiesta normalmente como una linfadenitis que involucra uno o mas nódulos linfáticos que drenan la nasofaringe, el pulmón o el abdomen (Griffin et ál, 94). Cuando la lesión afecta exclusivamente a nódulos linfáticos o pequeñas áreas del pulmón, el animal puede no presentar síntomas durante toda su vida (Wilson, 1979). Los ciervos a menudo contienen gran número de estos microorganismos sin mostrar evidencias de enfermedad (Buchan et ál, 1990). Una distribución más generalizada de las lesiones, especialmente involucrando el pulmón, puede producir una emaciación progresiva, con tos y alteraciones respiratorias. Cuando un animal infectado demuestra evidencias clínicas la muerte sobreviene en una o dos semanas.

En los ciervos salvajes el 75% de las lesiones se localizan en el tórax y el 13% de los animales presentan tuberculosis generalizada, estando afectados pulmón y varios nódulos linfáticos (de Lisle et ál, 1985). En los ciervos de granja las lesiones se localizan principalmente en los nódulos linfáticos retrofaríngeos (Beatson et ál, 1984) o mesentéricos (Griffin, 1988). Este hecho puede estar relacionado con la ruta de transmisión, vía respiratoria o por ingestión. Las lesiones pueden formar abscesos que rompen en la piel o en el tórax (Stumpff, 1982; Griffin et ál, 1994).

Las lesiones encontradas son similares a las del ganado vacuno; un granuloma proliferativo (Stumpff, 1982), con formación de caseo y calcificación en lesiones antiguas (Buchan et ál, 1990). El tamaño es variable, de 1 milímetro a más de 10 centímetros de diámetro, con abundante formación de pus y rodeados de una cápsula muy fina. Las localizaciones preferentes incluyen los ganglios linfáticos retrofaríngeos, mediastínicos y mesentéricos. Al igual que en el vacuno, puede haber formación de cavidades en los pulmones y engrosamiento de la pleura. Otros órganos (riñón, peritoneo, testículos, útero, etc...) pueden estar igualmente involucrados (Clifton-Hadley et ál, 1991).

Histológicamente, la tendencia a formar abscesos más que granulomas es la principal característica. Debido a esta tendencia, algunos autores consideran que el ciervo es más sensible a *M. bovis* que el ganado vacuno (Towar et ál, 1965). Presentan dos tipos de lesiones. El primer tipo es un granuloma con un área de necrosis central, células epitelioides y células gigantes de Langhans, rodeadas de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, encapsulada en tejido fibroso. El segundo tipo es un absceso con células gigantes y epitelioides, y pus derivado de la necrosis de los neutrófilos (Clifton-Hadley et ál, 1991).

7.7.2. Diagnóstico

La sensibilidad de la intradermotuberculinización simple (*single intradermal tuberculin test*, SIDT) realizada en la región cervical con 0,1 o 0,2 mg de PPD bovina (1-2 mg/ml) oscila entre el 86% y el 87% de ciervos experimentalmente inoculados (de Lisle et ál, 1984) y animales muestreados (Beatson et ál, 1984), considerando cualquier reacción visible o

palpable como positiva. Se encontraron lesiones consistentes con tuberculosis en el 77% de los animales reactivos a la tuberculina. Esta prueba detecta animales seis semanas post-infección. Sin embargo, la amplia exposición a *M. avium* y a otras micobacterias saprofitas (de Lisle et ál, 1985; Griffin, 1988) produce altos niveles de reacciones cruzadas (sensibilización no específica) o falsos positivos a la PPD bovina (Griffin et ál, 1994). Las intradermotuberculinizaciones frecuentes en cortos intervalos de tiempo, realizadas para detectar la rápida diseminación de la infección en el periodo entre éstas, pueden causar supresión de las posteriores reacciones, disminuyendo la sensibilidad de la intradermorreacción (Corrin et ál, 1987).

La tuberculinización comparativa (*comparative cervical test*, CCT), utilizando 0,2 mg de PPD bovina y 0,05 mg de PPD aviar, fue introducida con el objeto de incrementar la especificidad (Carter et ál, 1985; Carter et ál, 1986). Estos investigadores obtuvieron una sensibilidad del 92% y una especificidad superior al 98% en animales experimentalmente infectados. Esta prueba presenta una gran variabilidad en condiciones de campo, su sensibilidad oscila entre el 31 y el 90%, y la especificidad entre el 61 y el 88% (Stuart et ál, 1988; Griffiths, 1989; Philip, 1990; Griffin et ál, 1992). La utilización de la tuberculinización comparativa en rebaños con riesgo de infección está desaconsejada.

La prueba de transformación linfocitaria (*lymphocyte transformation*, LT), que específicamente valora la capacidad de reacción de los linfocitos T frente a antígenos de microorganismos, y la detección de anticuerpos séricos mediante ELISA han sido también evaluadas para el diagnóstico de la tuberculosis en ciervos. Un estudio piloto inicial, utilizando la LT en animales de rebaños infectados, demostró una sensibilidad del 95% y una especificidad del 92% respecto a la necropsia para el diagnóstico de la tuberculosis en ciervos de rebaños infectados (Griffin et ál, 1986; Griffin et ál, 1987).

El ELISA para detectar anticuerpos séricos frente a PPD bovina, PPD aviar y varios péptidos micobacterianos considerados específicos de *M. bovis*, como el MPB70 (Harboe et ál, 1984), alcanza una sensibilidad del 86% y una especificidad del 98% (Griffin et ál, 1991). La respuesta inmune humoral frente a la tuberculosis en el ciervo aparece más

tempranamente, aunque los títulos son bajos en animales sin lesiones visibles (NVL) o con lesiones encapsuladas. Las técnicas de ELISA pueden utilizarse para el diagnóstico no solamente de la enfermedad severa, sino también en casos menos avanzados (Griffin et ál, 1994). Los títulos de anticuerpos aumentan conforme la enfermedad progresa, y en los animales con múltiples lesiones diseminadas (tuberculosis generalizada) están significativamente incrementados (Buchan et ál, 1990). Estos animales a menudo son anérgicos a la introdermotuberculinización y no responden a la estimulación linfocitaria (Buchan et ál, 1990). El ciervo ha sido propuesto como modelo animal de la tuberculosis humana debido a las similitudes encontradas en la respuesta inmune y en la patología de la enfermedad (Buchan et ál, 1990).

La combinación de la LT y del ELISA se denomina *blood test for tuberculosis* (BTB); determina diferentes rutas inmunitarias y puede ser utilizado conjuntamente con la intradermoreacción para detectar los animales infectados y la severidad de la afección (Griffin et ál, 1991). El uso combinado de estas pruebas aumentó la sensibilidad a 95,8% en un estudio de campo (Griffin et ál, 1994), conservando una especificidad superior al 98% (Deer Research Laboratory, University of Otago, 1992).

Ni las lesiones macroscópicas ni los hallazgos histológicos son patognomónicos de la infección por *M. bovis* (Clifton-Hadley et ál, 1991). El diagnóstico definitivo requiere el aislamiento e identificación del microorganismo (Pritchard et ál, 1988). Sin embargo, no siempre es posible cultivar *M. bovis*, por lo tanto, el cultivo negativo no garantiza el status de animal libre de tuberculosis (Griffin et ál, 1994). *M. bovis* puede ser aislado del 5 % de los animales que no muestran evidencias de lesiones de tuberculosis en la necropsia (Beatson et ál, 1984).

7.7.3. Otras micobacterias

Los ciervos son altamente sensibles a *M. avium*; este microorganismo puede ser cultivado de hasta el 10% de las lesiones compatibles con tuberculosis en los ciervos. Produce también lesiones tuberculosas (Jorgensen et ál, 1976), normalmente purulentas, caseosas o

granulomatosas en la pared intestinal y en los ganglios linfáticos mesentéricos. Por diseminación hematógena puede alcanzar el hígado y el pulmón, donde produce lesiones miliare y una septicemia terminal (Griffin, 1988). *M. paratuberculosis* ha sido descrito en varias especies de ciervos (McKelvey, 1987; Reiman et ál, 1979).

7.8. TUBERCULOSIS EN EL JABALÍ

M. bovis se ha aislado con prevalencias entre el 20 y 30% en cerdos salvajes (*Sus scrofa*) (Ekdahl et ál, 1970; Corner et ál, 1981; Essey et ál, 1981). Los animales infectados se encuentran ampliamente distribuidos en algunas áreas de Nueva Zelanda y Australia con tuberculosis endémica. En Hungría se confirmó la tuberculosis por *M. bovis* en el 20% de los jabalíes (*Sus scrofa*) estudiados entre 1985 y 1991 (Kormendy, 1992). La infección es también endémica en el jabalí verrugoso (*Phacochoerus aethiopicus*), probablemente introducida por ganado doméstico (Woodford, 1982).

Algunos autores consideran que el cerdo salvaje y el jabalí son hospedadores de último nivel; los animales se infectan al alimentarse con cadáveres de ganado vacuno, búfalo o porcino infectado. La transmisión a otros animales sería poco probable debido a la baja prevalencia de la enfermedad generalizada, la ausencia de lesiones pulmonares y la falta de contacto con otras especies (Corner et ál, 1981). Sin embargo, en un estudio realizado en 1989 y 1990 en Nueva Zelanda, el 31% de los animales presentaron lesiones tuberculosas confirmadas histológicamente. El 96% de los animales presentaban lesiones en la cabeza y un 33% también tenían afectado el pulmón, apuntando que *M. bovis* puede transmitirse en aerosoles entre los animales, y un 27% presentaba tuberculosis generalizada. Los animales mayores estaban más afectados, indicando una mayor oportunidad de infección. *M. bovis* se aisló del 39% de los animales cultivados, el resto de las lesiones se debía a otros patógenos; 2,4% a *M. avium* y 40% a actinobacilosis, estafilococosis e infestaciones parasitarias (Wakelin et ál, 1991). Si la distribución de los jabalíes infectados se solapa con la del ganado es probable que exista transferencia de la infección entre ambos (Wakelin et ál, 1991).

La infección por *M. avium* es rara en cerdos salvajes y jabalíes (de Lisle et ál, 1994).

7.9. TUBERCULOSIS EN EL TEJÓN

La infección por *M. bovis* en el tejón europeo (*Meles meles*) fue descrita por primera vez en Suiza, atribuida al contacto con un corzo infectado (Bouvier et ál, 1957). La prevalencia de la infección en las poblaciones de tejones, según estudios *postmortem* realizados en las carcasas obtenidas en las operaciones de control, oscila entre el 4,8 y el 37,1% en Irlanda (O'Connor et ál, 1989), y el 12 y 17% en Reino Unido (Dolan, 1993). La infección está ampliamente distribuida y se considera endémica en estos países.

La infección acontece frecuentemente en los animales jóvenes, a partir de las hembras infectadas a las crías (Nolan et ál, 1994). La transmisión, rápida dentro de un grupo social, es principalmente vía respiratoria. Los pulmones y los ganglios linfáticos asociados son los órganos habitualmente implicados. Otra posible ruta de infección son las heridas producidas en las luchas territoriales. La diseminación de la infección entre grupos sociales es baja.

La tuberculosis en los tejones es esencialmente una enfermedad crónica respiratoria, desarrollando una bronconeumonía progresiva. Las lesiones constan de una zona central necrótica y células epitelioides. La encapsulación y la calcificación son raras. La diseminación hematogena produce tuberculosis miliar en varios órganos, comúnmente en el pulmón y en los riñones (Nolan et ál, 1994).

En algunas áreas la presencia de la infección en los tejones no ha sido asociada con tuberculosis en el ganado, indicando que la infección puede automantenerse en la población de tejones, por lo que pueden ser considerados hospedadores de *M. bovis* (Wilesmith et ál, 1986; Cheeseman et ál, 1988). La falta de transmisión en estas zonas puede deberse a una baja densidad en la población de tejones y a un mínimo contacto con el ganado vacuno (Nolan et ál, 1994).

El tejón europeo constituye un reservorio de la infección por *M. bovis*. En algunos países (Reino Unido e Irlanda), los niveles bajos residuales de *M. bovis* en el ganado han sido atribuidos, en parte, a la transmisión de *M. bovis* a partir de tejones. Existe una asociación

entre brotes de tuberculosis de origen desconocido y la densidad de la población de tejones en Reino Unido e Irlanda. La eliminación de la población de tejones infectada solucionó la aparición de brotes en el ganado (Little et ál, 1982; Hewson et ál, 1987).

La transmisión de *M. bovis* de los tejones al ganado ha sido demostrada experimentalmente (Little et ál, 1982). Este riesgo de transmisión es bajo, y el ganado puede coexistir largos periodos de tiempo con tejones antes de infectarse (Wilesmith, 1983; Cheeseman et ál, 1988). Este riesgo puede ser estacional, coincidiendo con los períodos de mayor actividad de los animales en primavera (Wilesmith et ál, 1982). La densidad de población es un factor limitante. La transmisión de la infección puede ser indirecta, por contacto con materia excretada infectada, ya que los tejones tuberculosos eliminan intermitentemente una gran cantidad de microorganismos en la orina, las heces, el esputo y en el exudado purulento que contaminan el pasto y el agua de bebida del ganado (Little et ál, 1982; Brown et ál, 1992; Nolan et ál, 1994). El comportamiento aberrante y la pérdida de miedo que demuestran los animales en los últimos estadios de la enfermedad (Muirhead et ál, 1974), pueden ser los causantes de una exposición directa (Cheeseman et ál, 1981).

El riesgo de transmisión de los tejones al ganado parece ser además impredecible, lo que hace que el beneficio del control de la enfermedad en estos animales sea difícil de valorar a corto plazo (Nolan et ál, 1994). El problema de la tuberculosis en los tejones en Reino Unido e Irlanda es similar, en varios aspectos, a la existencia de los possums infectados con *M. bovis* en Nueva Zelanda; en aquellos ambientes compartidos la infección persiste en el ganado. Los possums mueren en tres o cuatro meses tras la infección, mientras que el tejón puede sobrevivir hasta cuatro años (Little et ál., 1982; Clifton-Hadley et ál, 1993).

7.9.1. Diagnóstico

El diagnóstico clínico y por cultivo de muestras obtenidas del animal vivo es muy limitado (Little et ál, 1982; Pritchard et ál, 1986). La prueba de la tuberculinización intradérmica demostró una sensibilidad muy baja comparando ésta y el examen *postmortem* en animales infectados (Little et ál., 1982; Pritchard et ál, 1986). Varios autores han sugerido

que la inmunidad de base celular está debilitada en esta especie (Morris et ál, 1979; Higgins et ál, 1984).

Los estudios serológicos utilizando la técnica de ELISA y el anticuerpo monoclonal MBS43 (Nolan et ál, 1991) alcanza una especificidad cercana al 100%, pero con baja sensibilidad. Existe una asociación entre el desarrollo de una respuesta por anticuerpos y la presencia de lesiones visibles de tuberculosis, identificando así los animales que eliminan *M. bovis*. La eliminación de los animales positivos a esta prueba reduciría el riesgo de transmisión, pero no erradicaría la enfermedad (Nolan et al., 1994). Actualmente, abandonada la aplicación del gas cianhídrico en las madrigueras, el control de los animales infectados se basa en la captura mediante trampas y el sacrificio humanitario, y se intenta desarrollar un método de vacunación oral con *M. vaccae* (McCarthy, 1993).

7.10. TUBERCULOSIS EN EL CONEJO Y LA LIEBRE

Existe unicamente un informe de tuberculosis por *M. bovis* en un conejo salvaje (*Oryctolagus cuniculus*) (Gill et ál, 1993). En Argentina, *M. bovis* se cultivó del 1,36% de liebres (*Lepus leporis*) (de Kantor et ál, 1984), y en Nueva Zelanda se identificó un caso en liebre marrón (*Lepus europaeus occidentalis*) en un área con alta prevalencia en possums (Cooke et ál, 1993). A pesar de su alta susceptibilidad a la infección experimental, es poco probable que estas especies tengan importancia epidemiológica en la transmisión de la infección. Comparten frecuentemente los habitats de animales tuberculosos, la ausencia de casos se debe probablemente al comportamiento específico de estas especies que evita un contacto directo con otros animales (Cooke et ál, 1993).

M. avium ha sido identificado en liebres en Reino Unido (Matthews et ál, 1977).

7.11. TUBERCULOSIS EN EL POSSUM

El marsupial possum de cola en cepillo (*Trichosurus vulpecula*) es un reservorio endémico de *M. bovis* en Nueva Zelanda (O'Reilly et ál, 1995). Esta especie es altamente

susceptible a la infección (Buddle et ál, 1994). Aproximadamente, entre un 2 a un 10% de la población está infectada (Morris et al., 1994). La transmisión de la infección entre estos animales es aerógena, principalmente de la madre a sus crías y asociada a las actividades de cortejo (Morris et ál, 1994). Una vez que aparecen síntomas clínicos en los animales, éstos mueren en pocos meses (Hughes et ál, 1994).

Las lesiones se localizan preferentemente en el pulmón y los ganglios linfáticos superficiales (Coleman, 1988; Morris et ál, 1994). Los tejidos de todos los animales enfermos examinados contienen grandes cantidades de bacilos (Smith, 1972; Buddle et ál., 1994), y éstos elimina bacilos a través del tracto respiratorio y de heridas en la piel (Ekdahl, 1970).

Se encontraron possums tuberculosos en granjas con problemas persistentes de ganado infectado, en áreas en donde era imposible erradicar la tuberculosis. La disminución del número de possums demostró una reducción posterior en el número de rebaños infectados (Livingston, 1991). Para reducir la prevalencia de la infección en esta especie, y por lo tanto la transmisión de la infección al ganado, se reduce la densidad de población total de possums. Actualmente este control se realiza por envenenamiento masivo con monofluoroacetato sódico (compuesto 1080) y trampas, permaneciendo en estudio el uso de vacunas y el control de la fertilidad.

7.12. TUBERCULOSIS EN MUSTÉLIDOS

La infección por *M. bovis* ha sido asimismo descrita en hurones (*Mustela putorius furo*) (de Lisle et ál, 1993) y armiños (*Mustela erminea*) (Ragg et ál, 1995). La prevalencia de la infección en estas especies en zonas endémicas de Nueva Zelanda es 17.9 y 1,6% respectivamente (Ragg et ál, 1995). Destaca la alta proporción de casos con una gran cantidad de bacilos en las lesiones, que afectan principalmente a los ganglios linfáticos mesentéricos (Cooke et ál, 1995). Se han encontrado hurones infectados en áreas de tuberculosis en vacuno y ciervos con bajas poblaciones de possums y en donde no pudo hallarse la fuente de la infección (de Lisle et ál, 1993).

7.14. TUBERCULOSIS EN ANIMALES EXÓTICOS Y DE ZOO

Existen dos informes de tuberculosis por *M. bovis* en el papión perruno (*Papio cynocephalus anubis*) en el parque Masai Mara de Kenya (Tarara et ál, 1985; Sapolsky et ál, 1987). La incidencia de esta enfermedad en monos mantenidos en cautividad es alta, siendo los animales más susceptibles. Son igualmente receptivos a la infección por *M. tuberculosis* y *M. bovis*; siendo *M. tuberculosis* el 78% de las cepas aisladas (Francis et al., 1958). Otras especies de primates afectados con *M. bovis* incluyen el papión de guinea (*Papio papio*) (Thoen et ál, 1977), el hamadryade (*Papio hamadryas*) (Thorel, 1994), el chimpancé (*Pan troglodytes*) (Renner et ál, 1974), etc... También *M. africanum* ha sido descrito en chimpancés (Thorel, 1980).

La infección en el bisonte (*Bison bison*) se describió por primera vez en el National Buffalo Park de Wainwright (Canadá) en 1942 (Hawden, 1942), cuando el 53,7% de los animales sacrificados entre 1929 y 1939 presentaron lesiones de tuberculosis. El único contacto que mantuvieron estos animales fue con cérvidos; el 5,5% de los ciervos y alces que se sacrificaron presentaron también lesiones. La infección se detectó posteriormente en el 39% de los animales de Wood Buffalo National Park (Choquette et ál, 1961) tras la importación de animales infectados provenientes del rebaño de Wainwright. La prueba de la tuberculina realizada en estos animales obtuvo una sensibilidad del 66,6% y una especificidad del 89,6% (Tessaro, 1986). Entre 1983 y 1985 el 21% de los animales sacrificados mostraron lesiones, por lo que la infección se considera endémica (Tessaro et ál, 1990).

La tuberculosis bovina es endémica, con una prevalencia del 1,7%, en la población de búfalos asilvestrados (*Bubalus bubalus*) del Northern Territory australiano (Hein et ál, 1981). El 90% de los animales presenta lesiones principalmente torácicas, el 26% en el abdomen y el 25% en la cabeza. La infección afecta también al búfalo doméstico (*Bubalus bubalus*) en Egipto (El-Taweel, 1992) y en la India (Shukla, 1972).

La infección por *M. bovis* en el búfalo africano (*Syncerus caffer*) fue descrita por primera vez en 1963 en Uganda (Guilbride et ál, 1963). En 1982 fue detectada en el 10% de

los animales de esta especie del Parque Nacional Ruwenzori (Woodford, 1982). Actualmente afecta también al 25% de los rebaños de búfalo del Parque Nacional Kruger; la prevalencia de la enfermedad dentro de los rebaños infectados varía entre el 3 y el 33% (Huchzermeyer, 1993).

Otras especies salvajes en las que se ha descrito la infección por *M. bovis* incluyen el cobo lichi (*Kobus lechwe*) en Zambia, el cudu mayor (*Tragelaphus strepsiceros*) y duiquero de Grimm (*Sylvicapra grimmia*) en Suráfrica (Chillaud, 1992). En Zambia, el 33-36 % de los cobos lichi del río Kafue y de la Lochinvar Game Reserve presentaron lesiones de tuberculosis de las que se aisló *M. bovis* (Gallagher et ál, 1972; Clancey, 1977). También se ha detectado la infección por *M. bovis* en animales mantenidos en cautividad; en el tigre (Lumeij et ál, 1987), el leopardo de las nieves (*Panthera uncia*) (Thorel, 1994), el elan del Cabo (*Taurotragus oryx*), el ñu (*Connochaetes taurinus*), el yak (*Poephagus mutus*) (Stevens, 1994), el cobo acuático (*Kobus ellipsiprymnus*) (Montali et ál, 1990), el rinoceronte negro (*Diceros bicornis*) (Mann et ál, 1981) y el rinoceronte blanco (*Ceratotherium simun*) (Dalovisio et ál, 1992). Los animales mantenidos en cautividad tiene más riesgo de padecer tuberculosis que los animales libres en su medio ambiente natural, principalmente debido al estrés y a la masificación (Thoen et ál, 1984; Grange et ál, 1990).

7.14. TUBERCULOSIS EN PINNÍPEDOS

La enfermedad se ha detectado en el león marino australiano (*Neophoca cinerea*), en la foca peletera de Nueva Zelanda (*Arctocephalus forsteri*) y en la foca peletera de Australia (*Arctocephalus pusillus doriferus*) de un parque acuático y salvaje (Forshaw et ál, 1991; Cousins et ál, 1993). De las lesiones encontradas en el tracto respiratorio o generalizadas se aisló un microorganismo compatible con *M. bovis* en función de su actividad en las pruebas bioquímicas y su patogenicidad, pero con características antigénicas diferenciadas, ya que todos los aislados carecían de niveles de MPB70 detectables (Cousins et ál, 1993). El mismo microorganismo se aisló de la tuberculosis pulmonar desarrollada por su entrenador.

M. fortuitum (Lewis, 1987), *M. smegmatis* (Gutter et ál, 1987), *M. chelonae* (Boever

et ál, 1976) y *M. marinum* (Morales et ál, 1985) pueden también afectar a estas especies.

7.15. TUBERCULOSIS AVIAR

La distribución de la micobacteriosis aviar es mundial. *M. avium* produce tuberculosis en probablemente todas las especies de aves. La susceptibilidad a la enfermedad varía entre especies, afectando especialmente a las aves acuáticas, gallináceas, columbiformes, psitácidas, paseriformes, rapaces y estrucioniformes (VanderHeyden, 1994). La enfermedad está casi siempre causada por los serotipos 1, 2, 3, 6 y 8 (Grange et ál, 1990; Gerlach, 1994).

Existen otras micobacterias que pueden ser aisladas de las aves: *M. tuberculosis* (Hinshaw, 1933; Ackermann et ál, 1984; Woerpel et ál, 1983; Hoop et ál, 1996), *M. genavense*, *M. fortuitum*, *M. gordonae* y *M. nonchromogenicum* (Hoop et ál, 1996). *M. genavense* es una micobacteria de crecimiento lento y difícil (Böttger et ál, 1993), descrita inicialmente como agente etiológico de infecciones diseminadas en pacientes inmunocomprometidos (Böttger et ál, 1992; Hirschel et ál, 1990; Nadal et ál, 1993). *M. genavense* causa el 31% de las micobacteriosis en aves mascotas, frente al 13% originadas por *M. avium*.

La incidencia de la tuberculosis aviar está influenciada por condiciones ambientales, factores genéticos y la edad (Cromie et ál, 1991). Es más común cuando la densidad de población es alta, por ejemplo en vías fluviales, aviarios y colecciones zoológicas, en donde este microorganismo puede ser la causa de alta mortalidad anual (Cromie et ál, 1991; VanderHeyden, 1994). La incidencia detectada por necropsia alcanza el 14% y 33% (Montali et ál, 1976; Keymer et ál, 1982; Cromie et ál, 1991; Juan et ál, 1996). En general en aves exóticas supera a la incidencia en animales de granja. La aparición de la enfermedad en animales de más edad se debe al largo periodo de incubación y a un riesgo de exposición acumulado (Mutalib et ál, 1988). Los cambios en la mortalidad pueden deberse a dos motivos: (1) si el porcentaje de animales infectados que desarrolla la enfermedad es constante, entonces un aumento de la infección, según el ambiente esté más contaminado con cepas patógenas eliminadas por los animales enfermos, provocará un aumento en la mortalidad, y (2) un

aumento de la susceptibilidad (Cromie et ál, 1991).

Las fuentes de la infección son el suelo y el agua fuertemente contaminados por aves infectadas. Las micobacterias del complejo MAI se transmiten principalmente por la ruta fecal-oral, reflejándose en el predominio de lesiones en el tracto gastrointestinal y en el hígado (VanDerHeyden, 1994). Por una posterior diseminación hematógena alcanzan bazo, médula ósea, pulmón, sacos aéreos, piel, gónadas y menos frecuentemente, riñón y cerebro (Montali et ál, 1976; Gerlach, 1994; VanDerHeyden, 1994). Otras vías de infecciones son la inhalación o las heridas. Columbiformes y anseriformes desarrollan principalmente lesiones pulmonares; y una aguda bacteremia puede observarse en gruiformes, columbiformes y algunas passeriformes.

La micobacteriosis suele presentarse como una enfermedad debilitante crónica, con escasa respuesta a los antibióticos. Los síntomas clínicos varían ampliamente e incluyen pérdida de peso, depresión, diarrea, poliuria, disnea, distensión abdominal debida a la organomegalia y alteraciones del plumaje, que aparece decolorado. Pueden localizarse masas subcutáneas, o en el saco conjuntival, ángulo del pico, y orofarínge. Si existe osteomielitis y artritis se encontrará cojera (Gerlach, 1994; VanDerHeyden, 1994). En gallinas la enfermedad causa muertes periódicas en los meses de primavera, en pequeñas explotaciones de animales mantenidos en corrales o libres, alimentados con granos de cereal en el suelo y con acceso a la hierba (Mutlib, 1988).

Los órganos afectados pueden presentar granulomas (forma tuberculosa típica) o un aumento difuso (forma atípica). Los centros necróticos de los granulomas no se reblandecen en las aves, probablemente por una diferencia en el sistema enzimático de los heterófilos, y tampoco existen la caseificación y calcificación distrófica centrales ni la cápsula fibrosa de las lesiones observadas en los mamíferos (Montali et ál, 1976; VanDerHeyden, 1994). Estas lesiones redondeadas, irregulares y de tamaño variable, están formadas por el acúmulo de macrófagos y células gigantes multinucleadas. En su interior aparece un gran número de bacilos ácido-alcohol resistentes (Mutlib et ál, 1988). La apariencia de las micobacteriosis es similar a la de las neoplasias, especialmente a los linfomas (Panigrahy et ál, 1983; Juan

et ál, 1996). Las formas crónicas de la enfermedad se caracterizan por lesiones tuberculosas muy extensas localmente, pero poco generalizadas; las formas agudas corresponden a tuberculosis miliar (Juan et ál, 1996). En aves de corral aparece una mezcla de nódulos de diferentes tamaños, con centro caseoso. Paseriformes, columbiformes, anátidas y psitácidas suelen revelar pocos cambios macroscópicos y raramente desarrollan granulomas tuberculosos clásicos, por lo que pueden pasar desapercibidas (Panigrahy et ál, 1983; Remington, 1993; Gerlach, 1994; Macwhirter, 1994). Microscópicamente, las lesiones difusas en estas aves se deben a un aumento histiocitario de los órganos afectados, que contienen un gran número de bacilos ácido-alcohol resistentes (Montali et ál, 1992; Gerlach, 1994; VanDerHeyden, 1994). También se han descrito lesiones hepáticas poliquísticas producidas en aves acuáticas por *M. avium* (Roffe, 1989).

El diagnóstico *antemorten* de la tuberculosis aviar es difícil debido a la variación de los síntomas, no característicos (Panigrahy et ál, 1983), y al escaso valor del análisis hemático, ya que a menudo las alteraciones presentes en aves con tuberculosis localizada o diseminada son mínimas (VanDerHeyden, 1994). Los valores de las enzimas tisulares pueden estar ligeramente aumentados, pero en menor medida que con otras infecciones por bacterias, virus o clamidias.

La utilización de los tests serológicos es limitada, ya que la respuesta inmune predominante es de base celular, por lo que los niveles de anticuerpos pueden no estar correlacionados con la infección. La aglutinación en porta (*slide agglutination*, SA) puede ser realizada con un antígeno comercial para la detección del serotipo 2. El test intradérmico con tuberculina aviar ha sido utilizado en gallinas de granja, pero no se recomienda porque está frecuentemente asociado a resultados falsos negativos, principalmente en los estadios inicial y tardío de la enfermedad, y es siempre negativo en psitácidas infectadas (Gerlach, 1994; VanDerHeyden, 1994). La anergia de una infección extensa podría también existir en las aves (Forbes et ál, 1993).

El tratamiento de las micobacteriosis en las aves es controvertido, debido a la falta de información sobre la efectividad de la quimioterapia y del potencial zoonótico. La terapia

implica dosis diarias de una combinación de antibióticos utilizados en las infecciones en seres humanos: etambutol, rifampicina, rifabutina, estreptomicina, azitromicina, claritromicina y ciprofloxacina (Ritchie, 1990; VanDerHeyden, 1994). *M. avium* suele ser resistente a la isoniacida. La duración del tratamiento no ha sido determinada, pero es preferible la extensión del tratamiento al menos a un año, con frecuentes diagnósticos (Snyder et ál, 1994; VanDerHeyden, 1994). Sin embargo, antes de emprender un tratamiento debe tenerse en cuenta el pronóstico incierto, la falta de informes sobre la dosificación adecuada, la eliminación de bacterias y el riesgo potencial para personas inmunocomprometidas y para otras aves. Estos tratamientos son difíciles de aplicar en aves salvajes o en poblaciones numerosas y por el momento se han limitado a mascotas (VanDerHeyden, 1994).

La erradicación de esta micobacteriosis es casi imposible debido a la naturaleza crónica de la enfermedad, la dificultad para detectar los portadores asintomáticos y la resistencia ambiental de las micobacterias. El control se basa en: (1) eutanasia de los animales afectados (Forbes et ál, 1993), (2) cuarentenas de hasta un año para los animales que van a ser incorporados al aviario, (3) eliminación frecuente del material fecal y desinfección del suelo, y (4) activos programas de vigilancia, incluyendo tinciones de ácido-alcohol resistencia y cultivos de lesiones encontradas en las necropsias (Montali et ál, 1992). La protección del resto de la población con una vacuna está en estudio (Forbes et ál, 1993). El papel que desempeñan las aves de vida libre en la transmisión de estas micobacteriosis es difícil de valorar.

Dentro de los programas de control, un resultado rápido y exacto es esencial para la eliminación del individuo infectado, especialmente cuando los animales implicados son especies en peligro de extinción, forman parte de programas de cría con fines de reintroducción en la naturaleza y para la vigilancia de los animales que hayan estado en contacto. Sin embargo, el cultivo de micobacterias de tejidos de aves es frecuentemente negativo (Rae et ál, 1992; Remington et ál, 1993; Wilson et ál, 1994) o muy bajo. Los informes publicados citan tasas de aislamiento entre el 4,5% (Forster et ál, 1988) y el 38% (Keymer et ál, 1982). Del 40% de las muestras microscópicamente positivas no se obtuvo crecimiento (Hoop et ál, 1996). Entre las posibles razones de los fallos en el cultivo se

encuentra una escasa viabilidad de los organismos o requerimientos nutricionales específicos desconocidos.

***II. DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE
TUBERCULOSIS A PARTIR DE
MUESTRAS CLÍNICAS MEDIANTE
AMPLIFICACIÓN DEL ADN DE LAS
MICOBACTERIAS POR PCR***

Resumen

Las micobacterias de los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium-intracellulare* son microorganismos de crecimiento lento, por lo que la confirmación del diagnóstico utilizando los métodos convencionales requiere al menos 3 meses. Este trabajo describe el desarrollo de dos métodos de extracción del ADN de las micobacterias a partir de muestras clínicas. Los métodos combinan el tratamiento de descontaminación con una digestión enzimática, la inactivación de las micobacterias y una sencilla purificación del ADN para eliminar las sustancias inhibitorias. El ADN obtenido se amplificó con varias parejas de iniciadores específicas de género y de especie.

Los protocolos fueron evaluados en muestras clínicas procedentes de ganado vacuno, caprino, perros, gatos, animales salvajes y aves. Respecto al cultivo, la sensibilidad del protocolo inicial evaluada en muestras de ganado vacuno fue del 71.4%; y del 100% en los pequeños animales y en las aves. La sensibilidad del protocolo definitivo, evaluada en muestras de diferentes especies fue del 90,6%. Los tejidos de los animales procedentes de rebaños libres de tuberculosis fueron negativos.

La metodología descrita puede ser utilizada como una técnica de investigación rápida, complementaria del cultivo en el diagnóstico de la tuberculosis. La técnica de PCR reduce el tiempo necesario para el diagnóstico a 2 o 3 días, permitiendo además la detección de micobacterias no viables, o cuando otras micobacterias de crecimiento rápido están presentes en la muestra.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina producida por *M. bovis* es una zoonosis que produce importantes pérdidas económicas. El método oficial de diagnóstico utilizado en las campañas de erradicación es la intradermotuberculinización. La revisión de los datos citados en las revistas especializadas sugiere que su sensibilidad oscila entre el 66 (Wood et ál, 1991) y el 72% (Francis et ál, 1978). La especificidad de la prueba es alta, pero su capacidad para diagnosticar la infección depende de la prevalencia en el rebaño (Mausner et ál, 1985). La proporción de ganado positivo, pero sin evidencias de tuberculosis, aumenta cuando el nivel de infección es bajo (Monaghan et ál, 1994). Además, la interpretación de la prueba es subjetiva y los resultados pueden ser falsificados, por lo que es necesario contrastar estos datos con los obtenidos por otros métodos diagnósticos.

Las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* pueden causar tuberculosis pulmonar, digestiva o diseminada en perros y gatos (Snider et ál, 1971). Estos animales pueden contraer la infección al convivir con ganado o seres humanos infectados (Foster et ál, 1986). Los perros son igualmente sensibles a *M. tuberculosis* y a *M. bovis*, pero la mayor parte de los casos de tuberculosis canina en las áreas urbanas se debe a *M. tuberculosis* adquirido por contacto con portadores humanos. Se considera que la tuberculosis en los gatos es mayoritariamente de origen bovino, generalmente a través de la ingestión de leche o carne infectada, aunque existen algunos casos de bronconeumonía causada por *M. tuberculosis* (Hawthorne et ál, 1957).

El diagnóstico de esta infección en los animales de compañía es difícil. En los estadios tempranos la enfermedad se desarrolla en los perros y gatos sin síntomas clínicos, e incluso animales con lesiones activas y abiertas pueden permanecer asintomáticos largos periodos de tiempo (Hawthorne et ál, 1957); cuando están presentes, los signos clínicos son inespecíficos (Clercx et ál, 1992). El test intradérmico carece de utilidad en estos animales, ya que aparecen tanto falsos positivos como negativos (Hawthorne et ál, 1957). Las lesiones macroscópicas de tuberculosis en perros y gatos asemejan lesiones sarcomatosas más que los típicos tubérculos (Anderson, 1971). No se conocen las dosis apropiadas del tratamiento con tuberculostáticos ni su eficacia. Debido a que suelen presentar lesiones abiertas, pueden

eliminar bacilos en el esputo, orina y heces (Jarret et ál, 1957), constituyendo un riesgo para las personas. Debido al peligro potencial y al pobre pronóstico, se recomienda la eutanasia de los animales infectados.

El complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* es potencialmente patógeno, pudiendo infectar a algunos mamíferos y a casi todas las especies de aves (Grange, 1990). El aislamiento de microorganismos de este complejo no se relaciona necesariamente con enfermedad, ya que son comunes en el ambiente. También existen otras micobacterias que pueden aislarse de las muestras aviares (Hoop et ál, 1996).

La confirmación definitiva de la tuberculosis en los animales está basada en el diagnóstico histopatológico y microbiológico (Jarret et ál, 1957). El diagnóstico histopatológico es a menudo confuso, especialmente en aquellas muestras que contienen un número reducido de bacilos. Además, existen otros microorganismos que son capaces de producir lesiones granulomatosas, semejantes a las encontradas en los animales tuberculosos (de Lisle et ál, 1993).

El cultivo es el diagnóstico definitivo para la confirmación de la tuberculosis; sin embargo, este procedimiento requiere de 1 a 3 meses, debido al crecimiento extremadamente lento de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium*. Tradicionalmente la identificación se ha basado en la morfología, características de la tinción y pruebas bioquímicas (Vestal, 1975). Para la identificación mediante pruebas bioquímicas de los aislados se necesitan 3 semanas adicionales. La sensibilidad del cultivo no es del 100%, y de algunas muestras clínicas, incluso con lesiones y microscopía positiva, no se obtiene cultivo (Duffield et ál, 1989; Hoop et ál, 1996), y en algunos casos puede reducirse al 50% (Daniel, 1990). En los últimos años se han desarrollado varios métodos rápidos de diagnóstico, como la utilización de sondas de ADN para la identificación de los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium-intracellulare* (Musial et ál, 1988; David et ál, 1989; Lebrun et ál, 1992). Sin embargo, ésta técnica no tiene la suficiente sensibilidad para ser aplicada directamente en las muestras clínicas.

Para superar estas limitaciones varios autores han aplicado la reacción en cadena de

la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) para la detección de microorganismos del complejo *M. tuberculosis*. La mayoría de los informes se han centrado en la amplificación de ADN extraído de muestras de esputos humanos (Thierry et ál, 1990; Eisenach et ál, 1991; Buck et ál, 1992; Cousins et ál, 1992; Kocagoz et ál, 1993; Savic et ál, 1992; Beige et ál, 1995), y hay muy pocos estudios de la aplicación del PCR para la detección de *M. bovis* en muestras tisulares (Liébana et ál, 1995; Wards et ál, 1995; Aranaz et ál, 1996). Aunque la técnica es muy eficaz en la identificación de colonias, su sensibilidad decae al ser aplicada en tejidos.

El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un método de extracción del ADN de las micobacterias a partir de muestras clínicas de animales que pudiera ser utilizado en la detección directa de los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium* para la confirmación rápida de estas infecciones. La sensibilidad de los protocolos descritos se evaluó en muestras artificialmente sembradas, así como en muestras obtenidas de diferentes especies animales. Los resultados del PCR directo se compararon con los obtenidos con los métodos de cultivo e identificación convencionales.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. INFORME DE LOS ANIMALES Y RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

Las muestras utilizadas en este estudio proceden de diferentes especies animales, y recibidas en el Laboratorio de Micobacterias (Departamento de Patología Animal I, Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria de Madrid) para el diagnóstico definitivo de tuberculosis. En todos los casos se recogió material patológico para la tinción específica de micobacterias, cultivo, y para la extracción directa del ADN a partir de la muestra y posterior amplificación mediante la PCR. El planteamiento general de trabajo aparece esquematizado en la figura 1.

2.1.1. Ganado vacuno y caprino

La mayor parte de las muestras de ganado vacuno estudiadas proceden de las campañas de erradicación de esta infección en las Comunidades Autónomas de Catalunya y Madrid. Un reducido número fueron enviadas desde Cantabria, León y Guadalajara. Se incluyó un grupo control de animales negativos procedentes de un rebaño libre de tuberculosis. Las muestras se recogieron en el matadero, en donde la necropsia de los animales se realizó siguiendo la técnica recomendada (Corner et ál, 1990). Se seleccionó el material lesionado, y en los casos en los que no se detectaron lesiones macroscópicas visibles se recogieron los ganglios linfáticos mediastínicos, bronquiales y retrofaríngeos, así como pulmón.

Las muestras de cabras proceden de explotaciones situadas en las Comunidades autónomas de Cataluña y Madrid que participaron en diversos estudios de evaluación de la prueba de interferón-gamma (Rothel et ál, 1990) en el ganado caprino (Vidal et ál, 1995).

2.1.2. Perros y gatos

Las muestras pertenecieron a 9 animales, cuatro perros y cinco gatos, de propietarios particulares. Los signos clínicos más significativos de estos animales consistieron en anorexia, vómitos, pérdida progresiva de peso, fiebre intermitente, aletargamiento, disnea e hipertrofia

de ganglios linfáticos. Los propietarios de dos de los animales habían tenido tuberculosis anterior al desarrollo de la enfermedad en sus animales de compañía. Los datos más relevantes de la anamnesis y de los síntomas clínicos aparecen resumidos en la tabla II.1. De estos animales, ocho fueron necropsiados en el Departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de Madrid, en donde también se realizó su estudio histológico; la muestra de otro animal fue enviada desde una clínica veterinaria como biopsia.

2.1.3. Animales salvajes

Dentro del estudio se incluyó un limitado grupo de muestras procedentes de animales salvajes también susceptibles de padecer esta infección. Las muestras consistieron en pulmón y ganglios linfáticos de dos ciervos (*Cervus elaphus*), y de ganglios linfáticos o granulomas articulares de 4 jabalíes (*Sus scrofa*) del Parque Natural de Monfragüe (Cáceres).

2.1.4. Aves

En el estudio se investigaron asimismo varias muestras de tejido hepático y granulomas subcutáneo y articular de aves recibidas en el laboratorio para la identificación del agente causal (Tabla II.2.), incluyendo animales dedicados a la producción, procedentes de propietarios particulares y animales salvajes. También se procesaron 12 muestras de heces de nidos de águilas.

Tabla II.1. Datos de la anamnesis de los 4 perros y 5 gatos cuyas muestras se recibieron para el diagnóstico de tuberculosis.

Caso	Raza y sexo	Manejo y entorno	Edad (a)	Alimentación	Signos de enfermedad y condición	Observaciones
Perro 1	Mestizo, macho	Único, casa	3	Casera	Pérdida de peso, locomoción dolorosa, emaciación	Propietario con TB
Perro 2	Cocker, macho	Perrera	5	Casera y comercial	Pérdida de peso, fiebre, anorexia, debilidad, emaciación	
Perro 3	Pastor alemán, macho	Único, casa	11	Casera	Pérdida de peso, disnea, tos, emaciación	
Perro 4	Pastor alemán, macho	Único, casa	9	Comercial	Pérdida de peso, disnea, diarrea, emaciación	
Gato 1	Siamés, macho	Único, casa	8	Casera	Pérdida de peso, anorexia, polidipsia, poliuria, disnea, deshidratación	
Gato 2	Europeo, hembra	Único, casa	9	Casera y comercial	Pérdida de peso, fiebre, anorexia, emaciación	
Gato 3	Persa, hembra	3 gatos, casa	8	Casera y comercial	Masa abdominal palpable, cojera, buena condición	Propietario con TB
Gato 4	Mestizo, macho castrado	Animalario de universidad	7	Comercial	Hipertrofia bilateral de los ganglios linfáticos retrofaríngeos, buena condición	
Gato 5	Europea, hembra	Único, casa	5	Comercial	Pérdida de peso, tos, fatiga, disnea, deshidratación y anorexia desde hacía 3 meses	

Tabla II.2. Muestras de aves procesadas en este estudio.

Caso	Cuadro clínico y localización de la lesión	Origen de los animales
Gallinas domésticas (<i>Gallus domesticus</i>)	Proceso crónico con anorexia, pérdida de peso y descenso de la puesta Grandes lesiones hepáticas granulomatosas	Pequeña explotación particular, Sierra de Madrid Ponedoras mantenidas en el campo, adquiridas en varios puntos
Gallinas domésticas	Descenso de la puesta Lesiones hepáticas granulomatosas	Explotación industrial
Perdiz (<i>Alectoris rufa</i>)	Lesiones granulomatosas en hígado y bazo	Granja de cría para repoblación, Castuera (Badajoz)
Azor (<i>Accipiter gentilis</i>)	Lesión hepática	Parque Nacional de Doñana
Bubo (<i>Bubo bubo</i>)	Animal muy emaciado, atropellado	
Águila imperial ibérica (<i>Aquila adalberti</i>)	Heces recogidas de los nidos de cría, para control rutinario	Parque Nacional de Doñana
Canario (<i>Serinus canarius</i>) ^a	Diarrea crónica, letargia, plumaje erizado Ligera esplenomegalia, y granulomas multifocales en el hígado, bazo, pulmón y riñón	Criador particular
Amazona de frente blanca (<i>Amazona albifrons</i>)	Granuloma cutáneo (biopsia)	Aviario del zoo de Barcelona
Guacamayo (<i>Ara spp.</i>)	Granuloma en la articulación	Propietario particular

^a (Ramis et ál, 1996)

ESQUEMA GENERAL DE DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO DE TUBERCULOSIS

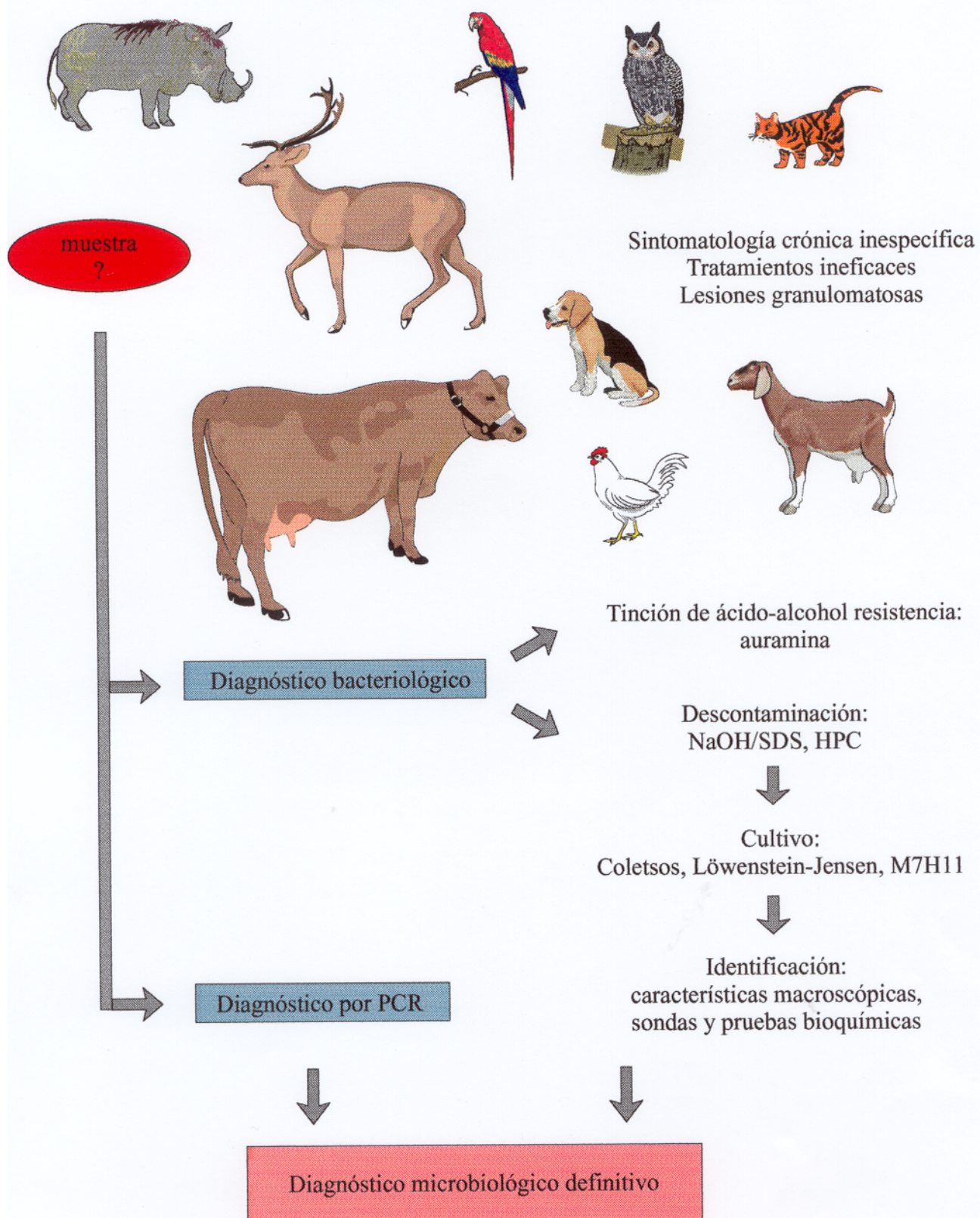


Figura II.1

2.2. BACTERIOLOGÍA

Las muestras se conservaron congeladas a -80°C para evitar la pérdida de viabilidad de los bacilos. Para su procesamiento se descongelaron y mantuvieron a 4°C . Siempre se conservó una parte de la muestra congelada para la repetición del análisis en caso de que el cultivo fuese negativo. Todas las operaciones que implicaban riesgo biológico se realizaron en una cabina de flujo laminar Bio-II-B (Telstar) utilizando medidas de protección personal (bata, mascarillas y guantes desechables). El material utilizado (placas Petri, hojas de bisturí, pipetas pasteur, tubos de centrifuga, tubos eppendorf, puntas de pipeta, etc...) era estéril y antes de eliminarlo se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos. La esterilización del mango del bisturí, pinzas y asa de platino se realizó en un *sterilbio* (PACISA). Como desinfectante rutinario se utilizó una solución de fenol al 5% o Virkon (Antec Int. Suffolk).

2.2.1. Observación microscópica directa: tinción de fluorescencia

Para la observación microscópica directa rutinaria se eligió la tinción de fluorescencia porque permite revisar un mayor número de campos en el mismo tiempo y se detectan más fácilmente las micobacterias. Las improntas realizadas a partir del tejido se secaron al aire y se fijaron al mechero. Se tiñeron con auramina fenolada siguiendo el método de Smithwick (1976). Cada preparación se cubrió durante 15 minutos con una solución de auramina fenolada filtrada, preparada con 0,1 g de auramina O (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en 10 ml de etanol al 96%, mezclada con una disolución de 3 g de cristales de fenol (Sigma Chemical Co.) en 87 ml de agua destilada. Se eliminó el resto con agua. Posteriormente se cubrió con la solución decolorante (0,5% de ácido clorhídrico concentrado en etanol al 70%) durante 2 minutos y se lavó con agua. Se añadió durante unos segundos fucsina fenicada del método Ziehl Neelsen como tinción de contraste, eliminando el sobrante con agua y dejando secar al aire. Las tinciones se examinaron a 400 aumentos en un microscopio de fluorescencia de transmisión (Nikon). Cada porta se revisó durante 10 minutos barriendo en zigzag toda la preparación. Los bacilos ácido-alcohol resistentes aparecen amarillos sobre un fondo tisular de color rosa fuerte. El informe del resultado se hizo principalmente cualitativo (positivo o negativo) y en algunos casos también cuantitativo, según el número de bacilos ácido-alcohol

resistentes encontrados en la preparación.

2.2.2. Cultivo

El tejido se fragmentó en pequeños trozos con ayuda de hojas de bisturí y se homogeneizó con agua ultrapura estéril (ultra pure water system, Barnstead), en un homogeneizador tipo stomacher (IUL Ltd) durante 10 minutos. Se aplicaron dos métodos de descontaminación diferentes.

a. Descontaminación por el método de Tacquet y Tison

La homogeneización se realizó con aproximadamente 5 gramos del tejido en 4,5 ml de agua. Dos alícuotas de este homogeneizado, de 2 ml cada una, se descontaminaron con el método propuesto por Tacquet et ál (1961). Siguiendo éste, se añadieron 3 ml de la solución descontaminante de hidróxido sódico 1%-laurilsulfato sódico (Sigma Chemical Co.) 3%, agitando suavemente y dejando actuar 30 minutos a temperatura ambiente. Se neutralizaron con una solución estéril de ácido ortofosfórico al 8,75% (pH 1,8), utilizando púrpura de bromocresol como indicador hasta alcanzar un pH aproximado a 6,8 (viraje a gris-amarillo).

b. Descontaminación por el método de Corner y Trajstman

Cada homogeneizado de 2 g del tejido en 10 ml de agua se descontaminó con cloruro de hexadecilpiridinium (HPC). Siguiendo el método propuesto por Corner et ál (1988), se añadió a éste el mismo volumen (10 ml) de una solución al 0,75% de HPC (Sigma Chemical Co.) y se mantuvo en agitación un periodo de tiempo máximo de 30 minutos, ya que no es conveniente que las micobacterias permanezcan en contacto con el HPC más de 1 hora en total.

Las mezclas procedentes de los dos métodos de descontaminación se centrifugaron a 3.500 r.p.m. durante 30 minutos en una centrífuga Sigma 3-10. Del sedimento de la alícuota descontaminada por Tacquet y Tison se sembró, con pipetas pasteur de plástico, 0,25 ml en la superficie de cada medio de cultivo. El sedimento obtenido con HPC se sembró utilizando hisopos estériles.

c. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron Coletsos (Coletsos, 1971) y Löwestein-Jensen (Löwenstein, 1953) adquiridos a BioMedics y a bioMérieux (Merci l'Étoile, France). Las muestras de las aves se cultivaron también en el medio Middlebrook Bacto mycobacteria 7H11 agar (Difco Laboratories, Detroit, MI). Las composiciones se detallan a continuación:

Coletsos, fórmula para 1.600 ml de medio:

Fosfato monopotásico.....	2,4 g
Sulfato magnésico.....	0,24 g
Citrato magnésico.....	0,5 g
Asparagina natural.....	3,6 g
Piruvato sódico.....	1,6 g
Glutamato sódico.....	1,6 g
Azul de tornasol.....	0,4 g
Solución oligodinámica de Berthelot.....	1,6 g
Oseína al 4%.....	160 ml
Cenizas de antracita.....	0,16 g
Fécula de patata.....	0,16 g
Verde malaquita al 2%.....	16 ml
Glicerina bidestilada.....	12 ml
Agua destilada.....	440 ml
Huevos completos.....	800 ml
Yemas de huevo solas.....	200 ml

Coletsos selectivo, con lincomicina (2 µg/ml), ácido nalidíxico (35 µg/ml) y cicloheximida (400 µg/ml).

Löwestein-Jensen, fórmula para 1.600 ml de medio:

Fosfato monopotásico.....	2,50 g
Sulfato magnésico.....	0,24 g
Citrato magnésico.....	0,60 g
Asparagina.....	3,60 g
Fécula de patata.....	30 g
Verde malaquita.....	0,40 g
Huevos completos.....	1000 ml

Middlebrook Bacto mycobacteria 7H11 agar, para 1 litro:

Digestivo pancreático de caseína.....	1 g
Sulfato amónico.....	0,5 g
Fosfato monopotásico.....	1,5 g
Fosfato disódico.....	1,5 g

Citrato sódico.....	0,4 g
Sulfato magnésico.....	0,05 g
Ácido L-glutámico.....	0,5 g
Citrato amónico férrico.....	0,04 g
Piridoxina.....	1mg
Biotina.....	0,5 mg
Verde malaquita.....	1 mg
Bacto agar.....	15 g

Los tubos se incubaron en estufas Wulkex a 28, 37 y 42°C. Los tubos inoculados con las alícuotas descontaminadas con NaOH y SDS se mantuvieron las primeras 48 horas inclinados y con el tapón parcialmente desenroscado, de forma que el líquido cubriera toda la superficie del medio y que se evaporara el exceso de éste. Todos los tubos se revisaron semanalmente, hasta el 5º mes, para comprobar la existencia de colonias.

2.2.3. Identificación

a. Comprobación de la ácidoalcohol resistencia del cultivo: tinción de Ziehl-Neelsen

Para comprobar la presencia de bacilos ácidoalcohol resistentes se realizaron tinciones de Ziehl-Neelsen a partir de los tubos con colonias sospechosas de ser micobacterias. Para la confirmación de los cultivos se prefirió esta tinción, ya que es la tradicionalmente aceptada para demostrar esta característica.

Los portas con la extensión de colonias se colocaron sobre unas varillas y se cubrieron con fucsina de Ziehl, calentando la parte inferior hasta que emitieron vapores 3 veces, evitando que la preparación llegase a hervir o se secara. La fucsina de Ziehl se preparó licuando por calentamiento 5 g de cristales de fenol en 90 ml de agua y añadiendo 10 ml de una solución saturada de fucsina (fucsina básica al 3% en etanol de 95°). Los portas se lavaron con agua y se añadió como decolorante ácido clorhídrico al 3% en etanol, dejándolos cubiertos durante 3-5 minutos. Tras este tiempo, se enjuagaron con agua y se tiñeron con una solución de azul de metileno hidrosoluble al 0,3% durante 30-60 segundos. Se aclararon de nuevo con agua y se dejaron secar al aire. La visualización se realizó en un microscopio óptico a 1.000 aumentos. Las micobacterias se observaron rosa fuerte, mientras que otras bacterias habrían aparecido de color azul.

b. Identificación convencional

El primer paso en la identificación tradicional de las micobacterias comprende la observación en los cultivos de una serie de características macroscópicas y de la velocidad de crecimiento. Estos datos permiten encuadrar éstos en un determinado grupo para realizar las pruebas bioquímicas convencionales características de cada uno (Vestal, 1975).

Principales características macroscópicas

La morfología de las colonias varía dependiendo del medio en que se desarrollen. En medio sólido con base de huevo, *M. tuberculosis* suele producir colonias rugosas, irregulares, con aspecto de migas de pan. *M. bovis* puede presentar colonias rugosas o lisas abombadas, más pequeñas. La mayoría de las micobacterias atípicas producen colonias lisas. Cuando el crecimiento es exuberante se denomina eugónico, cuando es pobre disgónico.

Para la observación de la formación de cordones (*cord factor*) se debe realizar una tinción de Ziehl-Neelsen del cultivo en suspensión en el agua de condensación de un tubo de medio. Las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* forman unos cordones, quedando agrupadas unas junto a otras, debido a la presencia de un lípido denominado dimicolato de trehalosa.

La pigmentación de las colonias se comprueba sembrando dos tubos de medio de cultivo a partir de las colonias sospechosas. Cuando presentan crecimiento se expone uno de ellos a la luz (lámpara de 60 vatios, durante 1 hora) y se reíncuba otras 24 horas a la temperatura óptima de crecimiento. Al cabo de este tiempo, en las colonias de algunas especies se puede observar la presencia de un pigmento amarillo-naranja; la especie es fotocromógena si es solamente en el tubo expuesto a la luz o escotocromógenas, si es en ambos tubos. Si no presentan pigmento se las considera no cromógenas.

La velocidad de crecimiento diferencia las micobacterias que tardan más de 7 días en crecer (especies de crecimiento lento) de las que producen colonias visibles en menos de ese tiempo (micobacterias de crecimiento rápido).

Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas más importantes utilizadas para la identificación de los crecedores lentos, en los que se encuadra el complejo *M. tuberculosis*, son la acumulación de niacina (Konno, 1956), la reducción de los nitratos (Virtanen, 1960), la hidrólisis del Tween 80 (Wayne et ál, 1964), la prueba de la arylsulfatasa (Kubica et ál, 1961) y la resistencia al TCH (Harrington et ál, 1966). Estas pruebas presentan varios inconvenientes; el primero de ellos es la necesidad de un crecimiento abundante para su inoculación, el segundo son los tiempos de incubación excesivamente largos, que en algunas pruebas alcanza 15 días, y el tercero que son bastante complicadas, poco fiables y variables. Por estos motivos, actualmente se utilizan las sondas para la identificación de los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium-intracellulare*, reservando las pruebas bioquímicas para la diferenciación dentro de éstos y para la identificación de las micobacterias atípicas.

Para la diferenciación de *M. tuberculosis* y *M. bovis* se utilizó la prueba de los nitratos, que permite detectar la presencia de la enzima nitrato-reductasa. El procedimiento consiste en la inoculación de un asa cargada en 2 ml de la solución de nitratos estéril (0,085 g de NO_3Na , 0,117 g de KH_2PO_4 y 0,485 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua destilada), y su incubación a 37°C durante 2 horas. Al añadir 1 ml de las soluciones A (0,08 g de ácido sulfanílico en 3 ml de ácido acético y 100 ml de agua destilada) y B (0,08 g de α -naftilamina en 3 ml de ácido acético y 100 ml de agua destilada) el color rojo-violeta indica positividad (*M. tuberculosis*) y el color pálido o rosa claro indica negatividad (*M. bovis*); en este caso debe añadirse polvo de zinc para comprobar si quedan nitratos o están completamente reducidos a nitrógeno. En cada prueba se utilizó un control positivo (*M. fortuitum*) y un control negativo (agua destilada estéril).

Identificación mediante sondas

Se utilizó la sonda de ADN AccuprobeTM *Mycobacterium tuberculosis complex culture identification test* (Gen-Probe, San Diego, CA), para la identificación de este complejo en los cultivos, siguiendo las recomendaciones y utilizando los reactivos suministrados por el fabricante (reactivos de lisis, de hibridación, de selección y la sonda).

Esta prueba se basa en la propiedad de dos cadenas de ácido nucleico complementarias para alinearse específicamente y asociarse formando una doble cadena estable (Kohne et ál, 1984). El sistema AccuProbeTM utiliza una sonda de ADN monocatenario marcada con una sustancia quimioluminiscente; esta sonda es complementaria del ARN ribosómico liberado por la lisis de los organismos del complejo *M. tuberculosis*, formando ambos un híbrido ADN:ARN estable que puede ser medido en un luminómetro Gen-Probe. Esta sonda no reacciona con micobacterias atípicas.

Cada muestra se preparó suspendiendo un asa del cultivo a identificar en un tubo con perlititas de vidrio, 100 μ del reactivo de lisis (solución tamponada con azida de sodio al 0,04%) y 100 μ l del reactivo de hibridación, agitando brevemente. Para liberar el ARN, se sonicó durante 15 minutos y se calentó 10 minutos a 95°C en un bloque térmico. Posteriormente, se transfirieron 100 μ l de cada producto sonicado a un tubo que contenía la sonda, incubándolo 15 minutos a 60°C para permitir una hibridación específica. La adición de 300 μ l del reactivo de selección, agitando energicamente e incubando 5 minutos a 60°C, permitió la diferenciación de la sonda hibridada de la no hibridada. Las lecturas de la quimioluminiscencia se realizaron en un lector PAL/AccuLDRTM, considerándose positivos los valores superiores al punto de corte de 900 PAL (unidades de medida de luz del PAL/AccuLDRTM), negativos los inferiores a 300 PAL y dudosos los situados entre éstos. En cada prueba se utilizaron cultivos conocidos de *M. tuberculosis* y *M. avium* como controles positivo y negativo, respectivamente.

2.3. IDENTIFICACIÓN EN MUESTRAS CLÍNICAS DE ORGANISMOS DEL COMPLEJO *M. tuberculosis* y *M. avium-intracellulare* POR PCR

2.3.1. Desarrollo de una técnica de extracción del ADN a partir de muestras tisulares

Con el fin de establecer las condiciones necesarias para la extracción del ADN a partir de muestras clínicas, se realizaron unas valoraciones previas sobre el efecto del método de descontaminación y de la inactivación, la pérdida de ADN en la centrifugación y la efectividad de la tripsina y de la proteinasa K.

a. Muestras utilizadas

Para estas determinaciones se utilizaron las muestras del hígado del perro caso número 1 (Uno H), de ganglio linfático (P4g) y de pulmón (P3p) de dos vacas, cuyas lesiones eran compatibles con tuberculosis, positivas a la tinción directa con auramina y cultivos también positivos.

b. Desarrollo de la técnica

Aproximadamente 7 g de cada muestra se homogeneizaron con 7 ml de agua (guardando las proporciones utilizadas para el método de Tacquet y Tison). Los homogeneizados de cada muestra se repartieron en 3 tubos de centrífuga, 2 ml en cada uno, que se procesaron de tres formas distintas. Las dos primeras alícuotas se descontaminaron por el método de Tacquet y Tison, se centrifugaron a 3.500 r.p.m. durante 30 minutos en una centrífuga Sigma 3-10 y se retiraron los sobrenadantes. El sedimento de la primera de ellas se inactivó a 75°C 1 hora y se centrifugó posteriormente a 12.000 r.p.m. durante 10 minutos en una centrífuga Eppendorf 5415-C, conservando por separado tanto el sedimento como el sobrenadante. El sedimento de la segunda alícuota no se trató térmicamente y tras una centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 10 minutos se seleccionó únicamente el sedimento. La tercera alícuota se centrifugó directamente, sin descontaminar, y el sedimento se inactivó 1 hora a 75°C antes de la centrifugación a alta velocidad, de la que también se seleccionó el sedimento. Estos cuatro productos de cada muestra se trataron con 150 µl de proteinasa K (1 mg/ml) 1 hora a 56°C, se purificaron con Magic o WizardTM Minipreps DNA Purification System (Promega Corp. Madison, WI) y el ADN extraído se amplificó por PCR como se detallará posteriormente.

Así mismo, y partiendo de la mismas muestras, se realizó un experimento en paralelo en otras dos alícuotas de cada muestra preparadas en las mismas condiciones, pero en las que se sustituyó el paso de la descontaminación por una incubación de 90 minutos a 37°C con tripsina, añadiendo a cada homogeneizado 5 veces su volumen de tripsina 0,25%. Posteriormente se centrifugaron a 3.500 r.p.m. 30 minutos. El sedimento de una de las alícuotas de cada muestra se inactivó a 75°C durante 1 hora, se centrifugó a alta velocidad y se conservó el sedimento y el sobrenadante. El sedimento de la segunda no se inactivó y

tras la centrifugación a 12.000 r.p.m. se guardó el sedimento. Estos tres productos de cada muestra se purificaron utilizando Wizard™ Minipreps DNA Purification System (Promega) y el ADN extraído se amplificó por PCR como se detallará posteriormente.

El protocolo de extracción se decidió en función de los resultados alcanzados con las distintas fracciones. El sedimento del método que implicaba la descontaminación de la muestra con NaOH y SDS más tratamiento térmico, obtuvo los mejores resultados respecto al ADN extraído y limpieza de la muestra, y por consiguiente, fue el aplicado a las muestras tisulares.

2.3.2. Evaluación del protocolo inicial de extracción del ADN a partir de las muestras

El esquema general de los protocolos de extracción del ADN aparece esquematizado en la figura II.2.

a. Muestras utilizadas en el estudio

El método de extracción desarrollado se evaluó en muestras de 100 vacunos clasificados en dos grupos. El grupo 1 incluyó 81 animales procedentes de rebaños infectados y que habían sido positivos en el test de la tuberculinización intradérmica o en test del IFN-gamma. El grupo 2 estuvo formado por 19 animales de rebaños libres de la infección, negativos a ambos tests y que no presentaron lesiones macroscópicas en la necropsia. También se utilizó para el diagnóstico de tuberculosis en las muestras de perros, gatos y aves recibidas.

b. Protocolo utilizado (Figura II.3)

Los sedimentos de la centrifugación a 3.500 r.p.m. durante 30 minutos de las alícuotas descontaminadas por el método de Tacquet y Tison se inactivaron a 75°C durante una hora en un baño de agua. Los productos inactivados se transfirieron a tubos eppendorf, se centrifugaron a 12.000 r.p.m. durante 10 minutos en una centrífuga Eppendorf 5415-C y se descartaron los sobrenadantes. Los sedimentos, en donde debían encontrarse todas las células, se lavaron para eliminar los restos de las soluciones de descontaminación con 1 ml

de agua destilada estéril y se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones. Tras retirar los sobrenadantes, los sedimentos se resuspendieron en 150 a 300 µl de una solución de proteinasa K 1 mg/ml (Sigma Chemical Co.) en TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8), y se incubaron a 56°C durante 1 hora en un baño de agua. En cada serie de muestras se procesaron un control positivo (50 µl de una dilución 10^{-2} de una suspensión de *M. bovis* aproximada al nº 5 de MacFarland) y uno negativo (agua destilada estéril).

Posteriormente, las muestras se hirvieron 5 minutos para desnaturalizar las proteínas y romper completamente las células bacterianas, y se dejaron 5 minutos más a temperatura ambiente. Tras una nueva centrifugación a 12.000 r.p.m. se seleccionó el sobrenadante, pasándolo a un nuevo eppendorf, para llevar a cabo la purificación del ADN.

La purificación del ADN se realizó utilizando el sistema WizardTM Minipreps DNA Purification System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. A cada sobrenadante obtenido del proceso de extracción se le añadió 1 ml de resina cargada positivamente (proporcionada por el fabricante), invirtiendo varias veces el eppendorf y dejándolo en contacto al menos 5 minutos para que el ADN se ligase a la resina. Al cabo de este tiempo, se pasó cada mezcla a unas jeringuillas de 2 ml acopladas en su cono a las minicolumnas, y se hizo pasar el líquido apretando suavemente con el émbolo. Para eliminar los restos celulares, las minicolumnas se lavaron pasando 2 ml de la solución de lavado (NaCl 90 mM, Tris-HCl 9 mM, pH 7,5, EDTA 2,25 mM, pH 7,5, 55% de etanol) por las jeringuillas. Las minicolumnas se secaron por centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 2 minutos para eliminar los restos de la solución de lavado. Finalmente, el ADN se eluyó con 50 µl de agua ultrapura estéril tratada con dietilpirocarbonato (Sigma Chemical Co.) al 0,1%, centrifugando de nuevo a 12.000 r.p.m. 20 segundos. El ADN purificado se conservó a 4°C.

2.3.3. Amplificación del ADN

El ADN obtenido y purificado se sometió a la amplificación mediante PCR con los cuatro grupos de oligonucleótidos iniciadores (Tabla II.3). Para evitar contaminaciones, los tubos de las reacciones de PCR se prepararon en una cabina de flujo laminar situada en un

laboratorio separado del utilizado para la Bacteriología y la extracción del ADN. Asimismo, todo el material utilizado (pipetas, gradillas, tubos, etc...) se dedicó exclusivamente para este propósito y las puntas de pipeta estériles utilizadas estaban provistas de filtro. Las soluciones y reactivos necesarios, así como los tubos ya preparados, se conservaron a -20°C alejados de ADN y productos de ADN ya amplificado.

a. Detección de la IS6110

Con los oligonucleótidos iniciadores IS41 e IS43 (Plikaytis et ál, 1991) se obtiene un producto de amplificación de 317 p.b.. Los tubos para la detección de la IS6110 fueron cedidos por la empresa Pharma Gen, S.A. (Tres Cantos, Madrid) e incluyeron un plásmido recombinante construido por mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, utilizando el sistema Muta-Gene In Vitro Mutagenesis Kit, versión 2 (BIO-RAD). Este plásmido control, *pPG10*, contiene las secuencias de los oligonucleótidos IS41 e IS43 en cadenas opuestas y separadas 1.250 p.b.. Se utilizó como control interno de la reacción de PCR para la detección de falsos negativos producidos por sustancias inhibidoras.

En cada tubo de 45 µl, utilizando condiciones estandar (1,5 mM de MgCl₂, 2,5 u *Taq* polimerasa de Promega), se inocularon 5 µl del ADN extraído de las muestras. La amplificación se realizó en el Thermal Sequencer (Pharmacia), en el PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc., Watertown, MA) o en el MiniCycler™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.). Los ciclos de temperatura aplicados consistieron en una desnaturalización a 94°C durante 10 minutos, seguida 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, hibridación a 68°C 2 minutos y extensión a 72°C 2 minutos, más una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los tubos se conservaron a 4°C hasta la realización de la electroforesis.

b. Detección del gen que codifica el ARNr 16S

Los iniciadores MYCGEN-F, oligonucleótido universal 246 (Edwards et ál, 1989) y MYCGEN-R, inverso y complementario de la secuencia 264 (Böddinghaus et ál, 1990) amplifican un fragmento de 1.030 p.b. específico del género *Mycobacterium*. Estos oligonucleótidos se encargaron a Boehringer Mannheim (Ebersberg, Alemania)

Los componentes para una reacción, en un volumen de 20 µl, fueron 2,5 µl de buffer 10x (Tris-ClH 200 mM, pH 8,55, (NH₄)₂SO₄ 160 mM, 1,5 g ASB/ml) (Bioprobe Systems, Montreuil sous Bois, France), 2 µl MgCl₂ 25 mM (Bioprobe Systems), 1,5 µl de los iniciadores MYCGEN (35 ng GEN-F y GEN-R/µl), 0,1 µl de la enzima BIOTAQ™ 5 u/µl (Bioprobe Systems), 2 µl de 2'deoxinucleósido 5'trifosfatos 2,5 mM cada uno (Ultrapure dNTP set, Pharmacia), en 11,9 µl de agua ultrapura estéril. Cada tubo se cubrió con 50 µl de aceite mineral (Sigma Chemical Co.) para evitar la evaporación y se conservaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

La enzima utilizada, BIOTAQ™, es una polimerasa de ADN de *Thermus aquaticus* sin la porción N-terminal de la enzima de longitud total. El peso molecular calculado por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS es 60-65.000 daltons. Esta delección la hace más estable frente al calor sin afectar a su actividad. La exposición repetida a 98°C en el buffer de la reacción no disminuye la actividad enzimática, mientras que la enzima de longitud total no soporta estos tratamientos. El buffer de almacenamiento es Tris-ClH 20 mM, pH 8,55, (NH₄)₂SO₄ 50 mM, EDTA 0,1 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, Thesit™ al 0,5% y 50% v/v de glicerol (Byoprobe Systems).

En cada tubo se inocularon 5 µl del ADN extraído a partir de las muestras de los animales. La inoculación de los tubos se realizó en el laboratorio de Bacteriología. Las reacciones se llevaron a cabo indistintamente en un PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc.) o en un MiniCycler™ Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc.) situados en un tercer laboratorio, donde se trabajó con el producto amplificado. Se utilizaron los siguientes ciclos de temperatura: desnaturalización a 94°C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 60°C durante 2 minutos y extensión a 72°C durante 3 minutos, terminando con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los tubos se mantuvieron a 4°C hasta la realización de la electroforesis. Se comprobó el perfecto funcionamiento de cada lote de tubos inoculando un control positivo (*M. bovis* aislado en el laboratorio) y un control negativo (agua ultrapura estéril).

En los casos en los que la especie de micobacteria no pudo ser identificada, el fragmento amplificado del gen ARNr 16S (Böddinghaus et ál, 1990) fue secuenciado por C. Pascual y M.D. Collins (Institute of Food Research, Reading Laboratory) utilizando el Sequenase version 2.0 sequencing kit (U.S. Biochemical Corporation, Cleveland, O) siguiendo el protocolo de Hutson et ál (1993).

c. Detección del gen que codifica la MPB70

Los iniciadores utilizados, TB1-F y TB2-R generan un producto de 372 p.b. en todos los miembros del complejo *M. tuberculosis* (Cousins et ál, 1991).

Preparados en las mismas condiciones y con las mismas precauciones que los anteriores, los componentes para una reacción de 20 µl, son 2,5 µl de buffer 10x (Bioprobe Systems), 2 µl de MgCl₂ 25 mM, 1 µl de los iniciadores TB1 sintetizados por Boehringer Mannheim (20 ng TB1-F y TB1-R/µl), 0,1 µl de la enzima BIOTAQ™ 5 u/µl (Bioprobe Systems), 2 µl dNTPs 2,5 mM cada uno (Ultrapure dNTP set, Pharmacia), en 12,4 µl de agua ultrapura estéril. Cada tubo se cubrió con 50 µl de aceite mineral (Sigma Chemical Co.) para evitar la evaporación y se conservaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

Estos tubos se inocularon también con 5 µl del ADN extraído de las muestras. El programa de temperatura y los termocicladores utilizados fueron idénticos a los de la detección del gen del ARNr 16S. Al igual que en el caso anterior, se comprobó el correcto funcionamiento de cada lote de tubos utilizando ADN extraído de una cepa de *M. bovis* aislada en el laboratorio como control positivo y agua ultrapura estéril como control negativo.

d. Detección de fragmentos específicos de *M. avium-intracellulare*

Este sistema incluye una combinación de iniciadores dirigidos al gen que codifica el ARNr 16S; los iniciadores 246 (MYCGEN-F) y 264 (MYCGEN-R), específicos para el género *Mycobacterium*, el iniciador MYCAV-R, específico para *M. avium* y el MYCINT-F, específico para *M. intracellulare* (Wilton et ál, 1992). Estos iniciadores hibridan en la misma región del gen, pero en direcciones opuestas. La amplificación del genoma de *M. avium* con los iniciadores MYCGEN-F y MYCAV-R genera un fragmento de 180 p.b.. La amplificación

de *M. intracellulare* con los iniciadores MYCINT-F y MYCGEN-R produce un fragmento de 850 p.b.. Los oligonucleótidos se solicitaron también a Boehringer Mannheim.

Las reacciones se desarrollaron en 25 µl, incluyendo 2,5 µl de buffer 10x (Tris-ClH 200 mM, pH 8,55, (NH₄)₂SO₄ 160 mM, 1,5 g BSA/ml) (Bioprobe Systems), 2 µl MgCl₂ 25 mM (Bioprobe systems), 1,5 µl de los iniciadores MYCGEN (35 ng GEN-F y GEN-R/µl), 1 µl de MYCAV (50 ng/µl), 1,5 µl de MYCINT (50 ng/µl), 0,1 µl de la enzima BIOTAQ™ 5 u/µl (Bioprobe systems), 2 µl de dNTPs (Ultrapure dNTP set, Pharmacia) 2,5 mM cada uno, en 9,4 µl de agua ultrapura estéril. Cada tubo se cubrió con 50 µl de aceite mineral (Sigma Chemical Co.) para evitar la evaporación y se conservaron a -20°C hasta el momento de su utilización. En cada tubo se inocularon 5 µl del ADN extraído a partir de las muestras de los animales. El programa de temperatura y los termocicladores utilizados son los anteriores.

Tabla II.3. Oligonucleótidos iniciadores utilizados: ADN diana, secuencia y tamaño esperado del producto amplificado en pares de bases (p.b.).

Iniciadores	ADN diana	Identificación	Secuencia (5' → 3')	Localización	Tamaño (p.b.)
IS43	IS6110	Complejo <i>M. tuberculosis</i>	TCA GCC GCG TCC ACG CCG CCA	568-588	317
IS41			CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG	884-865c	
MYCGEN-F	Gen del ARNr 16S	Género <i>Mycobacterium</i>	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	8-28 ^a	1.030
MYCGEN-R			TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA	1.027-1.046c ^a	
TB1-F	MPB70	Complejo <i>M. tuberculosis</i>	GAA CAA TCC GGA GTT GAC AA	276-295	372
TB1-R			AGC ACG CTG TCA ATC ATG TA	647-628c	
MYCAV-R	Gen del ARNr 16S	<i>M. avium</i>	ACC AGA AGA CAT GCG TCT TG	188-207c ^a	180
MYCINT-F	Gen del ARNr 16S	<i>M. intracellulare</i>	CCT TTA GGC GCA TGT CTT TA	185-204 ^a	850

c la secuencia del oligonucleótido es la complementaria de la secuencia del gen publicada.

^a Posición referida a *E. coli*.

2.3.4. Detección de los productos amplificados en gel de agarosa

La detección del producto amplificado mediante electroforesis se realizó en un tercer laboratorio para evitar contaminaciones con estos productos. Las bandas se observaron en geles de agarosa Molecular Biology Certified Agarose, Ultra Pure DNA Grade (BioRad Laboratories, Richmond, CA) al 2% en TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8), cargando 5 µl del producto más 5 µl de tampón de carga (glicerol al 10% y azul de bromofenol 0,08% en TAE). Fueron sometidas a electroforesis a 100 v durante 0,6 horas utilizando la fuente Model 200/2.0 Power Supply (BioRad Laboratories). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 45 minutos y se fotografiaron en un transiluminador Reprostar II (CAMAG, Muttentz, Suiza) con luz ultravioleta, con una MP4 Land Camera (Polaroid) utilizando película 667 (Polaroid).

2.3.5. Southern blotting e hibridación

El Southern blotting y la hibridación (Maniatis et ál, 1989) se realizó en una muestra de cada animal con dos objetivos: (1) confirmar la especificidad de las reacciones de PCR, y (2) comprobar si esta técnica tiene mayor sensibilidad que el gel de agarosa para detectar el producto amplificado.

a. Hibridación con sondas marcadas con ^{32}P

Este protocolo se aplicó en los fragmentos amplificados de las muestras de ganado bovino. Tras la electroforesis, los geles se lavaron en agua y se incubaron 2 veces durante 20 minutos a temperatura ambiente en una solución NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M, y dos veces durante 30 minutos en NH_4Ac 1 M, NaOH 0,02 M. Los fragmentos de ADN amplificados se transfirieron por capilaridad con NH_4Ac 1 M a membranas de nylon (Promega). El DNA se fijó a la membrana con luz U.V. Se prehibridaron 3 horas en 6x SSC (NaCl 0,6 M, citrato sódico 0,06 M)-5x Solución Denhardt (1x es 0,02% Ficoll-0,02% polivinilpirrolidona-0,02% albúmina sérica bovina)-0,5% dodecilsulfato sódico (SDS)-100 µg/ml de ADN de espermatozoos de salmón a 60°C.

Se utilizaron dos sondas, una dirigida a un fragmento interno de la IS6110, correspondiente a las posiciones 816 a 836 (5' CTC ACC TAT GTG TCG ACC TG 3'), y otra dirigida al control positivo interno (5' CGA CTC ACT ATA GGG CGA AT 3'). Estas sondas se generaron mediante PCR, incorporando el nucleótido dCTP marcado con P³². El producto de PCR se diluyó en 200 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) y se purificó con el mismo volumen de fenol-cloroformo-isoamiloalcohol (25:24:1) y centrifugando a alta velocidad 5 minutos. El ADN de la fase acuosa se precipitó con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2,2 de etanol al 96% frío durante 15 minutos a -20°C. Este precipitado se lavó con etanol al 80%, centrifugando 8 minutos y retirando el sobrenadante. El sedimento se centrifugó a vacío para secar el ADN obtenido.

Las membranas se hibridaron durante 3 horas a 60°C con las sondas marcadas (1,57x10⁶ cpm), previamente desnaturalizadas a 100°C y añadidas al tampón de prehibridación. Posteriormente, las membranas se lavaron a 60°C en 2,5x SSC-0,5% SDS durante 20 minutos y en 0,1% SSC-0,1% SDS 10 minutos. Se secaron al aire brevemente y se expusieron a película sensible a los rayos X en carcassas con pantallas intensificadoras a -70°C durante periodos de tiempo variable.

b. Hibridación con sondas marcadas con digoxigenina

Este método se utilizó para la confirmación de los productos amplificados obtenidos de las muestras de los perros y los gatos. Tras la electroforesis, el ADN amplificado se transfirió de los geles a unas membranas de nylon positivamente cargadas (Nylon Membranes Positively Charged, Boehringer Mannheim) empapadas en 2x SSC (NaCl 0,3 M, citrato sódico 0,03 M, pH 7,0), utilizando un 785 Vacuum Blotter (BioRad Laboratories) a 40 mbar con una bomba de vacío variable Vacuum Pump (BioRad Laboratories) durante 1 hora, cubriendo el gel con 0.4 M NaOH. Ya que las bandas de ADN que se deseaban transferir eran de tamaño pequeño, no se realizó depurinización con HCl. Después de la transferencia, las membranas se aclararon en 2x SSC, se secaron al aire, y el ADN se fijó a las membranas con 120 mJ/cm² en un SpectrolinkerTM XL-1000 U.V. crosslinker (Spectronics Corporation) o por calentamiento a 120°C durante 30 minutos. Se comprobó en el transiluminador que no quedaba ADN en el gel.

Las sondas IS6110 y MPB70, de doble cadena, se prepararon y marcaron con digoxigenina-11-dUTP (Boehringer Mannheim) mediante amplificación por PCR, utilizando las parejas de iniciadores INS1 (5'CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC 3') e INS2 (5'GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA 3') descritos por Hermans et ál en 1990, y TB1F y TB2R para amplificar fragmentos de 245 y 372 p.b., respectivamente, a partir de ADN de *M. bovis*. Las reacciones de la PCR se llevaron a cabo en las condiciones de la reacción y ciclos de temperatura anteriormente descritos, pero incluyendo digoxigenina-11-dUTP en la mezcla de desoxinucleótidos, en una proporción de 0,33 Dig-11-dUTP/0,66 dTTP para el marcaje de las sondas. Los productos de la amplificación se purificaron con WizardTM Minipreps DNA Purification System (Promega). Se comprobó mediante electroforesis que el tamaño de las sondas era el adecuado. La concentración de las sondas se estimó midiendo la DO₂₆₀ de una dilución 1/50 de la muestra.

Para evitar las uniones no específicas de las sondas a las membranas, éstas se prehibridaron al menos 2 horas en una solución tamponada de prehibridación (5x SSC, 0,1% N-laurilsarcosina, 1% agente de bloqueo Boehringer Mannheim y 0,02% SDS) a 42°C, en una relación de 2 ml por cada 10 cm² de membrana. Las sondas desnaturalizadas a 100°C durante 10 minutos, e inmediatamente mantenidas en hielo, se añadieron al fluido de hibridación en una concentración final de 20 ng/ml y se incubaron toda la noche a la misma temperatura. Posteriormente y para eliminar los restos de sonda no unida, las membranas se lavaron 2 veces, 5 minutos cada vez, en la solución de lavado nº 1 (2x SSC, 0,1% SDS), seguidos de otros 2 lavados, de 15 minutos cada uno, en la solución de lavado nº 2 (0.5x SSC, 0.1% SDS).

La presencia de la sonda marcada con digoxigenina unida al producto amplificado de la membrana se detectó utilizando un método colorimétrico, siguiendo las recomendaciones del fabricante y utilizando los reactivos suministrados en el DIG Nucleic Acid Detection Kit (Boehringer Mannheim). A temperatura ambiente, cada membrana se equilibró en el tampón de equilibrado (ácido málico 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) con Tween 20 al 0,3% (1 ml/cm² de membrana) durante 1 minuto en una placa de Petri limpia, y posteriormente en un tampón de bloqueo (reactivo de bloqueo diluido 1/10 en el tampón de equilibrado) 30

minutos. Tras este período, se añadió el anticuerpo marcado anti-DIG-fosfatasa alcalina, diluido 1/5000 en el tampón de bloqueo, (0,2 ml/cm²) durante 30 minutos. Para retirar el anticuerpo no unido se lavaron 2 veces, 15 minutos cada una, con el tampón de equilibrado (1 ml/cm²) y una vez en el tampón para la detección (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM) durante 2 minutos (0,2 ml/cm²). La detección se realizó con una solución con la proporción de 1 ml del último tampón con 4,5 µl de *nitroblue tetrazolium* (75 mg/ml de sal de tetrazolio nitroazul en dimetilformamida al 70%, suministrado por el fabricante) y 3,5 µl de *X-Phosphate* (50 mg/ml de sal toluidínica de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato en dimetilformamida al 100%, suministrado por el fabricante) en la oscuridad (0,1 ml/cm²), un tiempo que osciló entre 45 y 60 minutos. Una vez alcanzada la intensidad de color deseada en las bandas, las reacciones se detuvieron lavando las membranas en el tampón de equilibrado. Las imágenes obtenidas se fotocopiaron en transparencias de acetato (3M) y se fotografiaron.

2.3.6. Incremento de la sensibilidad con el desarrollo de un PCR nested

Para la amplificación Nested-PCR del ADN se necesitan dos pares de iniciadores; dos primers externos, TB1-F y TB1-R en nuestro caso, que dirigen la amplificación de una secuencia del genoma diana y dos iniciadores internos que dirigen la amplificación de un fragmento contenido en el producto definido y producido por los externos, incrementando así la sensibilidad y la especificidad.

a. Elección de los iniciadores

En función de la secuencia del fragmento generado por la amplificación con los iniciadores TB1-A y TB1-R se encargaron dos pares de iniciadores, los oligonucleótidos IP-A e IP-B (Bresatec Std) que deberían generar un producto de 202 p.b. y los oligonucleótidos NP-F y NP-R (Biotech International, Perth, WA), cuyo producto sería de 259 p.b. La puesta a punto de la reacción incluyó la optimización de las condiciones de ambas amplificaciones respecto a la concentración de iniciadores (10, 20 30 y 60 ng), de MgCl₂ (1, 1,5, 2 y 3 mM) y de enzima (0,5, 1 y 1,5 u). Los tubos se inocularon con 5 µl de diluciones 1/100 de suspensiones celulares equivalentes al no. 5 de Opacidad Estándar de *M. bovis* AN5 (obtenida

del CSIRO, Melbourne, Vic), *M. avium*, *M. intracellulare*, y ADN de *M. tuberculosis* (5 ng/ul), *M. bovis* (5 ng/ul) y agua MQ. La amplificación se llevó a cabo con dos programas de temperatura de 35 ciclos de 94°C durante 1 min (10 min en el primer ciclo), 61 o 58°C durante 2 min y 72°C durante 3 min (10 min en el último ciclo) en un FTS-320 Thermal Sequencer (Corbet Research, Mortlake, NSW). Los productos se analizaron por electroforesis a 100 V durante 30 min en gel de agarosa al 2% en TAE, con tinción con bromuro de etidio y se fotografiaron en un transiluminador con UV.

b. Combinaciones de los iniciadores utilizados

Con el objetivo de conocer el error de las anteriores reacciones se preparó una batería de tubos, incluyendo en cada uno de ellos un iniciador dirigido a la cadena 5' a 3' (TB1-F, IP-A y NP-F) y otro a la cadena 3' a 5' (TB1-R, IP-B y NP-R), utilizando las condiciones optimizadas de 0.5 u de enzima, 20 ng (iniciadores TB1 e IP) o 30 ng (NP) de cada iniciador, 2 o 3 mM de MgCl₂ y 61 y 50°C como temperaturas de hibridación.

c. Iniciadores NP-F y NP-R2

Los iniciadores NP-F (5' TGT CGG GCC AGC TCA ATC CG 3') y NP-R2 (5' AGG CTG TTA CCC TGA CCG GT 3') (Biotech Int.) generan un producto de 261 p.b. Para obtener los productos amplificados de mayor intensidad se optimizaron las concentraciones de los componentes de la reacción, titulando el MgCl₂ (1, 1,5, 2 y 3 mM) con diferentes concentraciones de iniciadores (20, 30, 40 y 60 ng de cada primer/tubo). Los tubos se inocularon con 5 ul de *M. bovis* AN5 1/100 y amplificaron durante 35 ciclos y una temperatura de hibridación de 61°C.

La composición final de los tubos incluyó 5 µl del buffer de la reacción 5x (Tris-HCl 335 mM, pH 8,8, (NH₄)₂SO₄ 83 mM, dNTP 1 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, EDTA 30 µM, gelatina 1 mg/ml) (Biotech Int.), MgCl₂ 1 mM, 30 ng de cada iniciador, 0,5 u de *Taq* polymerase (Biotech Int.) y agua ultrapura estéril hasta completar 20 µl.

Para comprobar el incremento de la sensibilidad del Nested-PCR frente al PCR con solamente los primers TB-1 se realizaron dos evaluaciones, inicialmente con suspensiones

celulares y posteriormente con ADN purificado. Se inocularon 5 μ l de una dilución decimal de una suspensión de *M. bovis* AN5 equivalente al no. 5 de la escala de Opacidad Estándar desde 10^{-1} a 10^{-8} previamente inactivados a 94°C, y 5 μ l de agua MQ en tubos conteniendo los iniciadores TB1-F y TB1-R, y NP-F y NP-R2. Posteriormente 5 μ l de la solución conteniendo los productos amplificados de la reacción de PCR con TB1-F y TB1-R se diluyeron 1/5 en agua ultrapura estéril y se inocularon en nuevos tubos con NP-F y NP-R2. En la segunda evaluación se inocularon 5 μ l de una dilución decimal de ADN de *M. bovis* AN5 desde 50 ng/ μ l a 5×10^{-18} g/ μ l y agua ultrapura estéril en tubos TB1-F y TB1-R y NP-F y NP-R2. Después se inocularon 5 μ l del producto de la reacción de TB1-F y TB1-R, así como diluciones 1/5 de éste, en nuevos tubos NP-FR2. Las condiciones de la reacción, los ciclos de amplificación y la detección fueron los anteriormente explicados.

2.3.7. Incremento de la sensibilidad modificando la técnica de extracción del ADN de las micobacterias a partir de muestras tisulares

a. Reacción de PCR

El DNA extraído en estos estudios se amplificó utilizando iniciadores que detectan el gen de la proteína MPB70 (TB-1), específica del *M. tuberculosis* complex, y la secuencia para el ARNr 16S (MYCGEN) específica del género *Mycobacterium*. La reacción se realizó en 25 μ l conteniendo 2.5 μ l de buffer 10x (1x es 20 mM Tris-HCl, pH 8.55, 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 150 μ g/ml de ASB), MgCl_2 2 mM, 200 μ M dNTP's, 0.5 unidades de la enzima BioTaq™ (Bioprobe Systems), 40 ng de TB-1 y 56 ng de MYCGEN. La amplificación se llevó a cabo con 35 ciclos de desnaturalización a 94° durante 30 segundos (10 min en el primer ciclo), hibridación a 61°C 2 minutos y elongación a 72°C durante 3 minutos (10 en el último). En todas las series hubo un control positivo (una dilución 1/100 de una suspensión de *M. bovis* equivalente al no. 5) y negativo (agua ultrapura estéril).

Para comprobar la sensibilidad de esta reacción se amplificaron en paralelo con este sistema y en una reacción con los iniciadores IS41 e IS43, dirigidos a la IS6110 (Thierry et ál, 1990) 5 μ l de las diluciones decimales (1 a 10^{-5}) de *M. bovis*, inactivadas a 100°C 10 minutos.

b. Evaluación de las posibles pérdidas de ADN en el protocolo inicial

La evaluación de los puntos críticos del protocolo inicial en los que puede producirse una pérdida de ADN, y por consiguiente una reducción de la sensibilidad, se llevó a cabo en diluciones de bacterias. Se prepararon suspensiones de cultivo de las cepas B165b y B2p, aisladas a partir de muestras clínicas de ganado vacuno, en tubos con perlas de vidrio y agua ultrapura estéril y mediante sonicación hasta obtener una opacidad aproximada al no. 5 de McFarland. A partir de esta solución inicial se realizaron diluciones decimales utilizando también agua ultrapura estéril.

Descontaminación con el método Tacquet y Tison

Con el objetivo de comprobar si este método produce la rotura de las micobacterias se descontaminaron alícuotas de 200 µl, añadiendo 300 µl de la solución descontaminante y neutralizando 30 minutos más tarde con H_3PO_4 al 8,75%. Las alícuotas descontaminadas se centrifugaron a 3.500 r.p.m. durante 30 minutos. Los sobrenadantes y los sedimentos (resuspendidos en el volumen inicial) se inactivaron y se sometieron a PCR. Posteriormente, ambos se purificaron con Wizard Minipreps DNA purification system (Promega) para repetir la amplificación.

Descontaminación con HPC

El posible efecto del HPC en las micobacterias se comprobó descontaminando 200 µl de las suspensiones con el mismo volumen de HPC al 0,75%, manteniéndolas en agitación 30 minutos y centrifugando a 3.500 r.p.m. 30 minutos. Los sobrenadantes y sedimentos (resuspendidos en el volumen inicial) se inactivaron y se sometieron a PCR. También se purificaron con Wizard Minipreps DNA purification system (Promega) para repetir la amplificación.

Tratamiento de inactivación

Las alícuotas de 200 µl se inactivaron a 75°C 1 hora y se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 15 minutos. Los sobrenadantes y los sedimentos (resuspendidos en 200 µl) se inactivaron a 100°C y se amplificaron por PCR.

Tratamiento con proteinasa K

Para cuantificar el efecto de la lisis producida por esta enzima se añadieron 200 µl de proteinasa K (1 mg/ml) (Sigma Chemical Co.) en TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8) a 200 µl de las diluciones 10^{-1} a 10^{-4} . Tras la incubación a 56°C durante 1 hora en baño de agua, las suspensiones se centrifugaron a 13.000 r.p.m. 10 minutos. Los sobrenadantes y los sedimentos (resuspendidos en 400 µl) se inactivaron a 100°C 10 minutos y se amplificaron por PCR.

Centrifugación

Para valorar la pérdida de ADN por este motivo, se centrifugaron alícuotas de 200 µl a 13.000 r.p.m. durante 15 minutos. Los sobrenadantes y los sedimentos (resuspendidos en 200 µl de agua) se inactivaron a 100°C 10 minutos y se amplificaron por PCR.

Purificación con Wizard Minipreps DNA purification system (Promega)

Se diluyeron 100 µl de las suspensiones 10^{-1} a 10^{-4} en 2 ml de agua ultrapura estéril; 5 µl se amplificaron por PCR directamente, y otros 5 µl tras la purificación de 1 ml de las diluciones con las Wizard Minipreps DNA purification system (Promega) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

c. Desarrollo de nuevos protocolos de extracción del ADN en homogeneizados sembrados

Se prepararon homogeneizados con 2 g de tejido en 2 y 10 ml de agua ultrapura estéril. Cada uno se sembró con 100 µl de la suspensión 10^{-1} y se descontaminaron respectivamente con los métodos de Tacquet y Tison, y de Corner y Trajstman, centrifugando a 6.000 r.p.m. (4.000 g) durante 30 minutos. Los sedimentos se resuspendieron en 500 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Ambos se procesaron siguiendo una modificación del protocolo utilizado para la extracción de ADN de bacterias y plantas con alto contenido en polisacáridos (Wilson et ál, 1987) que se utiliza en la preparación de ADN de cultivos para la tipificación. Se incubaron 3 horas a 37°C con 100 µl de lisozima (20 mg/ml) (Sigma Chemical Co), y 16 horas a 50°C con 100 µl de SDS 10% y 100 µl de proteinasa K (1 mg/ml TE). Cada suspensión se distribuyó directamente en 2 volúmenes, se añadieron a cada uno 100 µl de NaCl 5 M y 80 µl de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)/NaCl (NaCl 1,4

M, CTAB 10%) y se incubaron a 65°C 10 minutos. Posteriormente estas muestras se hirvieron, y tras la centrifugación los sobrenadantes se purificaron con 0,6 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y centrifugación a 6.500 r.p.m. 5 minutos. Las fases acuosas se trataron con las minipreps de Promega. El mismo procedimiento se siguió con homogeneizados sembrados con la dilución 10^{-2} .

Para comprobar si la aplicación de aceite era efectiva en la separación de las micobacterias aprovechando las características hidrófobas de su pared, se preparó un homogeneizado con 2 g de tejido y 3 ml de agua que se sembró con 100 μ l de la dilución 10^{-2} , y al que se añadió 5 ml de aceite. Se mantuvo en agitación durante 10 minutos, dejando separar las fases 20 minutos y se centrifugó a 1.500 r.p.m. 15 minutos para eliminar la fase acuosa. El sedimento se resuspendió en 5 ml de acetona y se centrifugó a 6.500 r.p.m. durante 5 minutos y se repitió de nuevo este paso. El sedimento se secó al aire durante 2 horas, a continuación se resuspendió en 500 μ l de TE y se procesó como en los casos anteriores.

d. Desarrollo de nuevos protocolos de extracción del ADN en tejidos naturalmente infectados

Se probaron 7 métodos de extracción del ADN (1 a 7) en las muestras c1M, procedente de una cabra, y B180, de una vaca. Ambas muestras fueron positivas en el cultivo para *M. bovis* y débilmente positivas en la tinción con auramina. De cada tejido se prepararon 7 homogeneizados, cada uno de ellos con 2 gramos de tejido. Los cuatro primeros, en 3 ml de agua ultrapura estéril, se descontaminaron con NaOH-SDS, los sedimentos se procesaron con los métodos 1 a 4. Otros dos homogeneizados, realizados con 10 ml de agua, se descontaminaron con HPC y los sedimentos se procesaron con los métodos 5 y 6. El último homogeneizado se realizó en 3 ml de agua y 5 ml de aceite, manteniéndolo en agitación durante 10 minutos, dejando separar las fases 20 minutos y centrifugar a 1.500 r.p.m. 15 minutos para eliminar la fase acuosa (método 7).

1. El sedimento se trató siguiendo el protocolo inicial ya descrito (2.3.2.b).
2. El sedimento se centrifugó a 12.000 r.p.m. 15 minutos, y el nuevo sedimento se lavó con 1 ml de agua y recentrifugó a alta velocidad. Este sedimento se resuspendió en 500 μ l de TE, a los que se añadió proteinasa K (1 mg/ml TE) e incubó 90 minutos a 56°C. Tras hervir la

muestra se seleccionó el sobrenadante. Este método equivale al protocolo inicial pero evitando la inactivación a 75°C durante 1 hora y posterior centrifugación.

3. El sedimento se resuspendió en 500 µl de TE. Se incubó con 100 µl de lisozima (20 mg/ml) a 37°C 3 horas, y después con 100 µl de SDS al 10% más 100 µl de proteinasa K (1 mg/ml TE). Se añadió 100 µl de NaCl 5 M y 80 µl de CTAB/NaCl (NaCl 1,4 M, CTAB 10%) y se incubaron a 65°C 10 minutos. Posteriormente estas muestras se hirvieron, y tras la centrifugación los sobrenadantes se purificaron con 0,6 ml de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1) y centrifugación a 6.500 r.p.m. 5 minutos.

4. El sedimento se resuspendió en 5 ml de acetona y se centrifugó a 6.500 r.p.m. durante 5 minutos y se repitió de nuevo este paso. El sedimento se secó al aire durante 2 horas y a continuación se procesó como en el método 3.

5. El sedimento de la primera alícuota descontaminada con HPC se procesó como en el método 3.

6. El sedimento de esta segunda alícuota se resuspendió en 5 ml de acetona como en el método 4 y se centrifugó a 6.500 r.p.m. durante 5 minutos, repitiéndose de nuevo este paso. El sedimento se secó al aire durante 2 horas, y se procesó como en el método 3.

7. La fase oleosa se mezcló con acetona y se procedió como en el anterior método.

En todos los casos el ADN fue purificado usando Magic Minipreps (Promega).

2.3.8. Evaluación del protocolo de extracción del ADN modificado

Los tres protocolos seleccionados fueron inicialmente comprobados en homogeneizados sembrados y en un pequeño grupo de muestras clínicas. El protocolo finalmente adoptado fue aplicado extensivamente a la totalidad de las muestras clínicas.

a. Preparación de los homogeneizados de tejidos sembrados artificialmente con *M. bovis*

Para los experimentos de evaluación de los protocolos modificados de extracción seleccionados se utilizó una cepa de *M. bovis* obtenida en nuestro laboratorio a partir de material diagnóstico bovino. La cepa fue cultivada en Coletsos (bioMérieux) a 37°C.

Se preparó un homogeneizado en un stomacher (IUL Ltd.) con ganglios linfáticos de

los animales del rebaño no infectado en una proporción de 3 gramos de tejido más 2 ml de agua destilada estéril. El homogeneizado se conservó a -20°C hasta su utilización. Se prepararon diluciones decimales seriadas del cultivo de *M. bovis* en agua estéril a partir de una suspensión bacteriana sonicada equivalente al número 5 de la escala McFarland Opacity Standard (Difco). Alícuotas de 2 ml del homogeneizado se sembraron con 100 µl de cada dilución y se extrajeron por los diferentes protocolos de preparación de la muestra y extracción del ADN.

b. Muestras clínicas

Las muestras clínicas consistieron en 135 muestras tisulares (pulmón, ganglios linfáticos o lesiones granulomatosas) recibidos para su diagnóstico rutinario de animales de rebaños infectados, así como 7 tejidos sin lesiones visibles de animales de un rebaño libre de tuberculosis. Todas estas muestras fueron examinadas mediante microscopía de fluorescencia y cultivadas como hemos descrito previamente. La identificación de los cultivos se basó en las características macroscópicas, pruebas bioquímicas estandar, sondas Accuprobe DNA^R (GenProbe) y PCR.

c. Protocolos seccionados

1. Protocolo inicial ya descrito (Figura II.3).
2. Protocolo intermedio: La técnica de extracción fue una modificación del primer protocolo pero evitando la inactivación por calor (75°C 1 hora).
3. Protocolo definitivo (Figura II.3): tres gramos del tejido (del área con lesiones o aleatoriamente si no las tenía) fueron homogeneizadas con 2 ml de agua destilada. Los homogeneizados fueron descontaminados con el método de Tacquet y Tisson (1%NaOH/3% SDS y neutralización con 8,75% H₃PO₄) y centrifugados a 4.500 r.p.m. durante 30 minutos. El sedimento se transfirió a un eppendorf y se lavó con 1 ml de agua destilada y centrifugó a 14.000 r.p.m. durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en 100 µl de lisozima (20 mg/ml) e incubó a 37°C durante 3 horas. Posteriormente, la suspensión se incubó durante toda la noche a 50°C con 150 µl de proteinasa K (1 mg/ml) y 100 µl de SDS al 10%. Tras la digestión, las muestras fueron hervidas durante 10 minutos y centrifugadas a 13.000 r.p.m. El sobrenadante se transfirió a nuevo tubo eppendorf y se mezcló con 100 µl de NaCl 5M y

80 µl de bromuro de hexadecil trimetil amonio (CTAB):4,1% NaCl precalentado e incubado a 65°C durante 10 minutos. Tras la adición de 600 µl de cloroformo:isoamiloalcohol (24:1) la muestra fue centrifugada a 6.500 r.p.m. 5 minutos. Finalmente, el DNA se recuperó de la fase acuosa utilizando las Wizard Minipreps DNA Purification System (Promega).

d. Amplificación del ADN por PCR

El ADN obtenido de cada muestra se amplificó mediante PCR con un sistema Multiplex que incluye una combinación de iniciadores, un par (246 y el reverso 264) dirigidos al gen que codifica para el ARNr 16S, específicos para el género *Mycobacterium* (Böddinghaus et ál, 1990), junto con los iniciadores TB1-F y TB1-R (Cousins et ál, 1991). Las reacciones se desarrollaron en 25 µl, con 2,5 µl de buffer de reacción 10x (Tris-HCl 200 mM pH 8,55, (NH₄)₂SO₄ 160 mM, 1,5 g BSA/ml), 2 µl de dNTPs 2,5 mM (Pharmacia), 2 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,5 U de Taq Polymerase (BioTaq™, Bioprobe Systems), 52,5 ng de cada oligonucleótido 246 y 264r y 20 ng de TB1F y TB1R, e inoculando 5 µl del ADN extraído.

La amplificación se realizó con 35 ciclos de hibridación a 65°C. Los productos de la amplificación se detectaron mediante electroforesis a 100 voltios 35 minutos, en gel de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml).

e. Amplificación del fragmento específico de género

El ADN extraído de 31 de estas muestras se amplificó también en dos reacciones para detectar el fragmento específico del género *Mycobacterium*. Los tubos se prepararon con 2,5 µl de buffer de reacción 10x (Tris-HCl 200 mM pH 8,55, (NH₄)₂SO₄ 160 mM, 1,5 g BSA/ml), 2 µl de dNTPs 2,5 mM (Pharmacia), 2 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,5 U de Taq Polymerase (BioTaq™, Bioprobe Systems) y los iniciadores. Los primeros contenían 52,5 ng de cada oligonucleótido MYCGEN-F y MYCGEN-R. Los segundos tubos incluyeron 40 ng del iniciador 264 (5' TCC CTT GTG GCC TGT GTG CA) (Böddinghaus et ál, 1990), complementario del MYCGEN-R y 40 del oligonucleótido universal pH (5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3'), que amplifican un fragmento de aproximadamente 520 p.b. El programa de temperaturas y la detección se llevó a cabo como en el caso anterior.

DETECCION DIRECTA DE MICOBACTERIAS
A PARTIR DE TEJIDOS MEDIANTE PCR

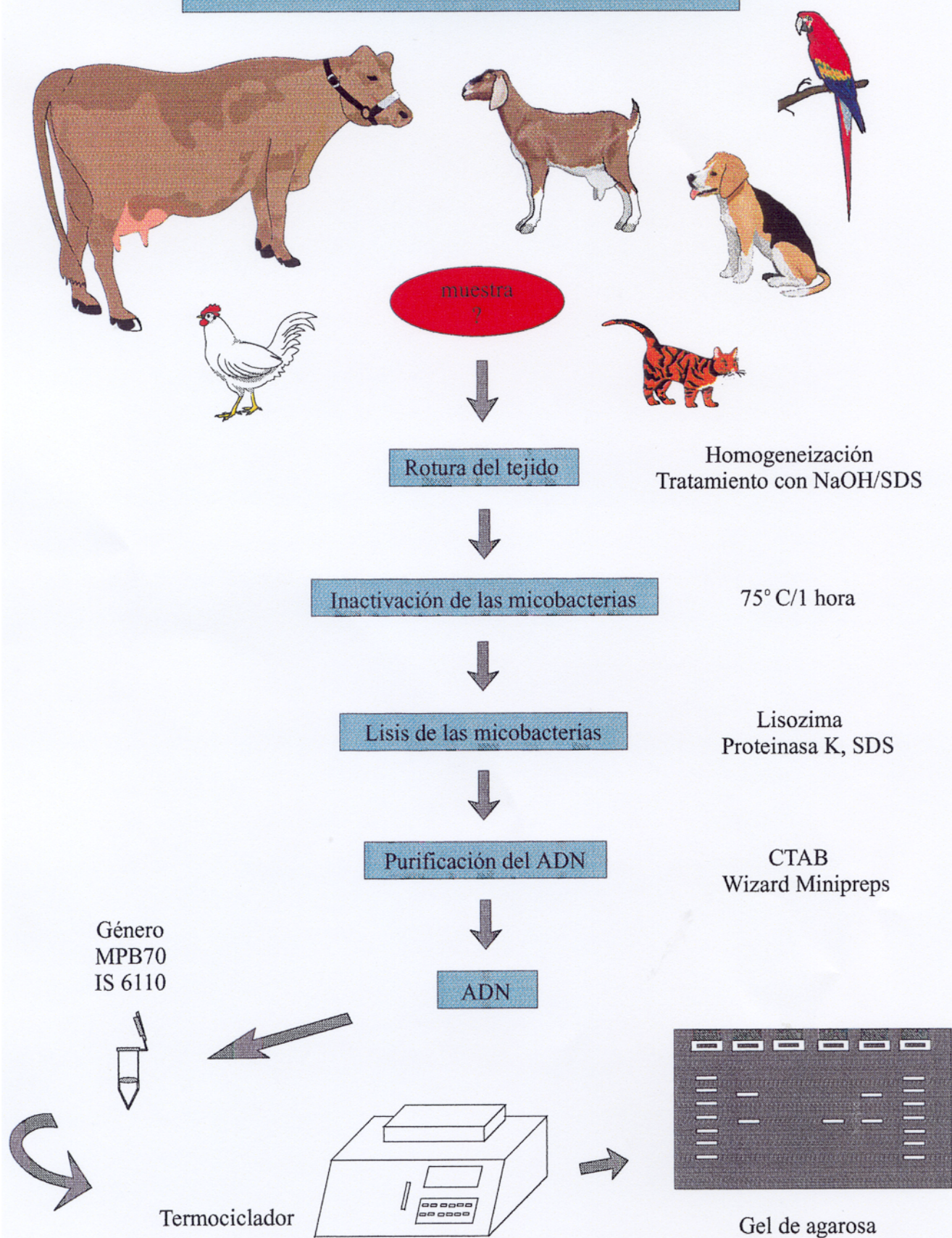
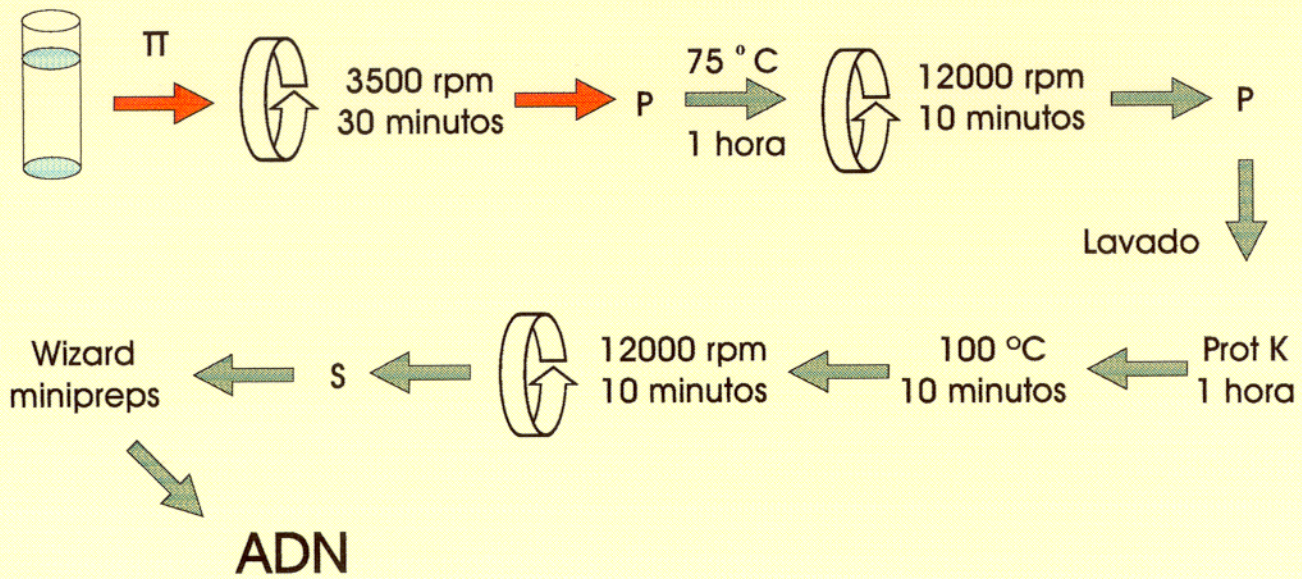


Figura II.2

Protocolo inicial



Protocolo definitivo

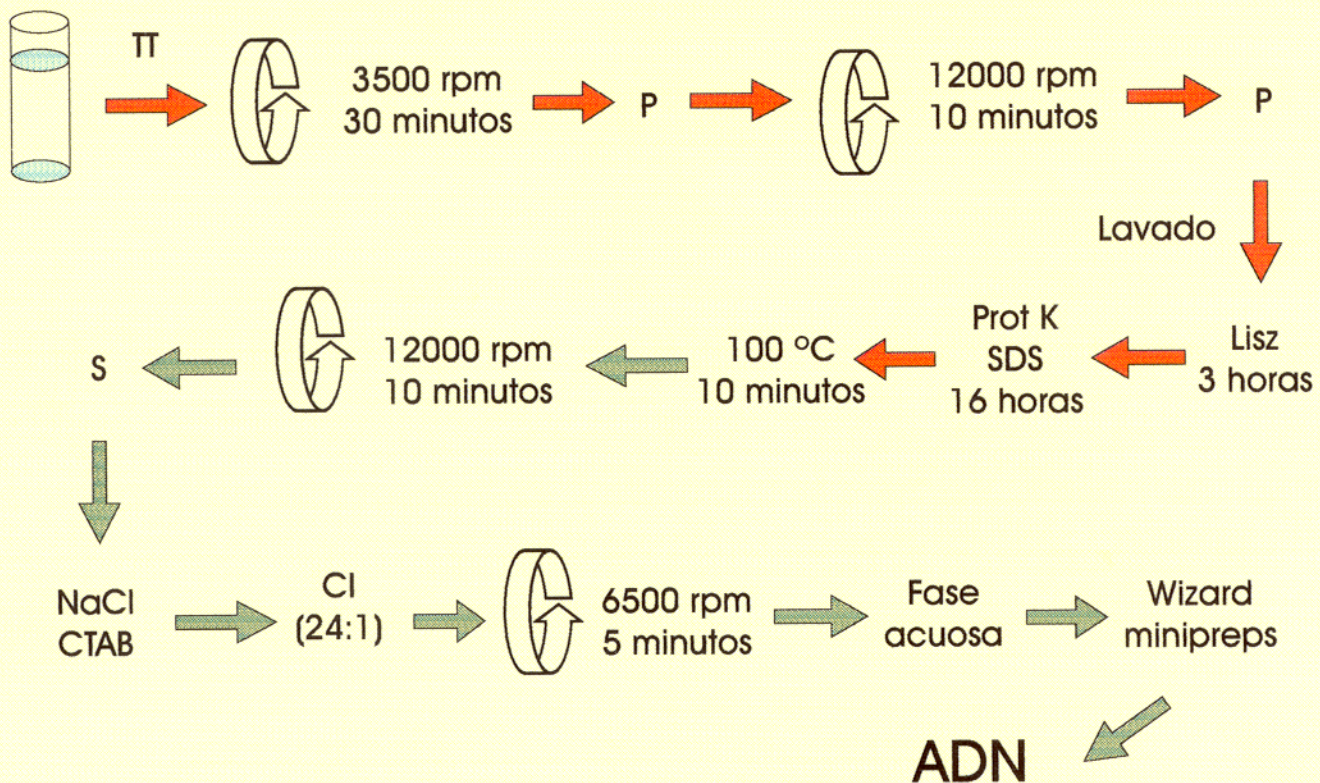


Figura II.3.

3. RESULTADOS

3.1. MÉTODO ELEGIDO PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE TUBERCULOSIS EN MUESTRAS CLÍNICAS MEDIANTE PCR

Los resultados en los que se basa la elección de la fracción de la muestra a partir de la cual realizar la extracción del ADN aparecen en la figura II.4. La extracción de ADN a partir de la alícuota sin descontaminar no obtuvo ninguna banda de amplificación, probablemente por insuficiente rotura del tejido. Si se obtuvieron bandas de producto amplificado a partir de las alícuotas descontaminadas; la rotura del tejido con NaOH y SDS disgrega el tejido y produce la liberación de las micobacterias, facilitando la posterior actuación de la proteinasa K.

Con la extracción llevada a cabo en el sobrenadante tras la centrifugación de la muestra descontaminada e inactivada por el calor, se obtuvieron varias bandas, una del tamaño esperado y otras inespecíficas, lo que significa que el tratamiento térmico produce lisis en un porcentaje de micobacterias por lo que existe una liberación del ADN de las micobacterias, aunque hay restos de ADN de tejidos que pueden reducir la especificidad de la prueba. Los mejores resultados se consiguieron en los sedimentos de la centrifugación de las muestras descontaminadas, estuvieran o no inactivadas térmicamente (Figura II.4). En este estudio preliminar se prefirió elegir la tratada térmicamente por seguridad en el trabajo de laboratorio. En los tratamientos realizados con tripsina no se obtuvo ningún resultado.

3.2. DIAGNÓSTICO POR PCR DE LAS MUESTRAS DE GANADO VACUNO

Cuarenta y nueve de los 81 animales seleccionados de rebaños infectados con *M. bovis* en virtud a sus resultados positivos en el test de la tuberculina intradérmica o del IFN-gamma fueron positivos en el cultivo (Tabla III.4). De estos 49 animales, 35 (71,4%) fueron diagnosticados como infectados mediante PCR. Dos de los 32 animales cultivo negativo de este grupo fueron PCR positivo. De los 30 animales cultivo y PCR negativo del grupo 1, 21 (70%) no presentaron lesiones macroscópicas y todas las muestras fueron negativas en la tinción con auramina fenolada. Los otros nueve animales sí tuvieron lesiones o algunas de sus

muestras fueron positivas en la tinción directa.

Todas las muestras de los 19 animales del grupo 2, de rebaños libres de tuberculosis, fueron cultivo y PCR negativo.

En la figura II.5 puede observarse la banda de 317 p.b. característica de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* tras la amplificación del ADN extraído de las muestras con los iniciadores IS41 e IS43. La especificidad de la reacción se confirmó mediante Shouthern blotting con sondas dirigidas al fragmento amplificado de la secuencia IS6110 y el control positivo interno de la reacción de PCR (Figura II.6).

Tabla II.4. Resultados del cultivo de *M. bovis* y del diagnóstico mediante PCR de las muestras de los animales de los grupos 1 y 2.

Resultado del cultivo	Número de animales			
	Grupo 1		Grupo 2	
	PCR positivo ^a	PCR negativo	PCR positivo	PCR negativo
Positivo	35	14	0	0
Negativo	2	30	0	19
Total	37	44	0	19

^a Producto amplificado detectado mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio

3.3. DIAGNÓSTICO POR PCR DE LAS MUESTRAS DE PERROS Y GATOS

Las muestras procedentes de los 9 animales recibidas en el Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) para el diagnóstico microbiológico de tuberculosis presentaron lesiones, en mayor o menor grado, compatibles con esta enfermedad. Sin embargo, en 4 de los 9 animales estaban en realidad causadas por otros procesos tumorales o infecciosos (nocardiosis, peritonitis infecciosa felina). La principal característica de las lesiones era su extensión y la variedad de órganos afectados, confirmando que los animales presentan síntomas de la enfermedad cuando está en un estado realmente avanzado, según ya han comentado otros autores. Cabe destacar además que, independientemente de la localización

inicial, en el perro y en los gatos casos 1, 3 y 5, las lesiones involucraban tanto la cavidad torácica como la abdominal; en el gato caso número 4 solo afectaban a la cavidad torácica.

El perro caso número 1 presentaba tuberculosis generalizada tanto en la cavidad abdominal como torácica. El pulmón se encontraba hemorrágico, con tuberculosis miliar en la pleura y el peritoneo. Existían grandes granulomas en el hígado y en los ganglios linfáticos mediastínicos y mesentéricos, así como numerosos granulomas subcapsulares en el riñón. Algunas lesiones estaban caseificadas. El animal mostraba también pequeñas lesiones granulomatosas en la piel, algunas de ellas estaban fistulizadas, conectando con el exterior. Las muestras de los perros casos número 2 (exudado pleural sanguinolento), número 3 (pulmón y ganglio linfático) y número 4 (hígado), presentaban macroscópicamente lesiones granulomatosas dudosas. La muestra del perro número 2 se aceptó ante la imposibilidad de obtener las lesiones del pulmón.

El pulmón del gato caso número 1 tenía aspecto neumónico abigarrado, pero no el característico de las lesiones tuberculosas. Los ganglios linfáticos mediastínicos estaban hipertróficos, y en un borde se apreciaba una pequeña lesión no granulomatosa. No se procesó ninguna muestra de la cavidad abdominal, aunque algunos órganos (hígado, ganglios linfáticos mesentéricos) presentaban lesiones. Las lesiones del pulmón del gato caso número 2 eran dudosas. La muestra recibida del gato caso número 3 consistió en una mezcla indeterminada de órganos conservada en mal estado, y en la que podía observarse caseum. Los ganglios retrofaríngeos del gato número 4 estaban muy agrandados y el pulmón tenía aspecto neumónico. Exhibían granulomas consistentes de color muy pálido, casi blanco, pero sin caseum evidente. El pulmón y los ganglios linfáticos mediastínicos también estaban afectados. En el gato número 5 se observó hemotórax, numerosos nódulos blanquecinos diseminados en pulmones, pericardio, ganglios linfáticos mediastínicos y bazo, hipertrofia de los ganglios linfáticos mesentéricos, engrosamiento de la pared del intestino e hígado graso.

Los resultados obtenidos de la tinción de las improntas con auramina fenolada y del cultivo de las muestras con lesiones compatibles con tuberculosis de los 9 animales (4 perros y 5 gatos) estudiados puede observarse en la tabla II.5.

Todas las muestras cuyas improntas fueron positivas en la tinción con auramina fenolada fueron posteriormente cultivo positivo. Así mismo, todas las muestras cultivo negativo fueron auramina negativo. Si se observó diferencia de positividad en las improntas; los bacilos ácido-alcohol resistentes eran mucho más abundantes en los gatos casos número 3, 4 y 5 que en las muestras del perro número 1 y en el gato número 1.

La principal limitación de la tinción directa a partir de la muestra es la falta de sensibilidad y la especificidad de esta técnica. Para que una muestra sea positiva en la microscopía directa es necesaria la presencia de aproximadamente 10^4 micobacterias/ml, lo que indica que todos los casos eran avanzados y muy infecciosos, incluso pudieron detectarse micobacterias en la piel fistulizada del perro caso número 1. La utilización de esta técnica fue solamente orientativa, ya que la falta de especificidad impide predecir que micobacteria es la causante de la enfermedad, puesto que las lesiones en órganos profundos y diseminadas pueden también estar producidas por *M. avium* y las lesiones cutáneas por diversas micobacterias atípicas.

Uno de los cuatro perros y tres de los cuatro gatos fueron cultivo positivo. *M. tuberculosis* se aisló del perro número 1 y de los gatos 3 y 4; *M. bovis* se aisló de los gatos 1 y 5.

Para la descontaminación previa de las muestras se utilizó el método de Tacquet y Tison, y en los 4 últimos gatos, también el método de Corner y Trajstman. El tiempo necesario para la obtención de crecimiento visible dependió del método utilizado y del medio de cultivo empleado, oscilando entre 20 y 50 días, siendo entre 10 y 15 días inferior en las descontaminaciones con HPC que con NaOH-SDS. En las muestras descontaminadas con HPC se apreció un mayor número de colonias, debido probablemente a que esta sustancia es menos tóxica y no afecta tanto a la viabilidad de las micobacterias (Corner, 1994). El crecimiento se obtuvo simultáneamente en los medios de Coletsos y Löwestein-Jensen, o bien de 1 a 2 semanas antes en el primero. Ambos medios permitieron el crecimiento de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. La media de las velocidades de crecimiento de los aislados de *M. tuberculosis* fue aproximadamente 32 días (36 días con la descontaminación por NaOH-SDS), frente a los 38

días necesarios para la obtención de crecimiento visible de *M. bovis*. El medio de Coletos selectivo se utilizó únicamente en muestras de los 3 primeros perros, pero no mostró ventajas respecto al normal, y puesto que no hubo contaminaciones en los cultivos, se dejó de utilizar en las siguientes. Todos los crecimientos se obtuvieron con una temperatura de incubación de 37°C, excepto la muestra de piel del perro caso número 1, que creció a 28°C.

Todos los animales de cuyas muestras se cultivaron microorganismos pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* (perro número 1 y gatos 2 a 5) pudieron ser diagnosticados igualmente por PCR al amplificar el ADN extraído a partir de sus muestras tisulares. En todos estos casos se obtuvieron las bandas de ADN amplificado del tamaño esperado: 317 p.b. para la IS6110, 372 p.b. para el gen que codifica la MPB70 y 1.030 p.b. para el fragmento específico del género *Mycobacterium* del gen que codifica el ARNr 16S. El resto de los animales, perros 2, 3 y 4, y el gato número 2 fueron cultivo y PCR negativo. El resultado del PCR junto con el cultivo de las muestras de los 9 animales sospechosos de padecer tuberculosis puede observarse en la tabla II.6.

Las figuras II.7 y II.9 muestran geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio en los que se detectan los productos de la amplificación del ADN extraído a partir de las muestras clínicas recibidas, con dos de las parejas de iniciadores utilizados. La especificidad de los productos amplificados se confirmó mediante hibridación con las sondas dirigidas a la IS6110 y la MPB70, como puede comprobarse en las figuras II.8 y II.10. En todos los casos fue suficiente la sensibilidad del gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, y no se observó mayor sensibilidad con la hibridación.

La identificación del complejo *M. tuberculosis*, en lugar de identificar aisladamente *M. bovis* y *M. tuberculosis* no es realmente un problema (Cousins et ál, 1991), ya que todas las especies son patógenas para los perros y gatos (entre otros animales) y para el hombre. *M. africanum* nunca se ha aislado de estos animales y *M. microti* sólo es patógeno para unos roedores. Estas especies están muy relacionadas, y algunos autores consideran que *M. bovis* y *M. africanum* deberían ser subespecies de *M. tuberculosis* (Goodfellow et ál, 1982; Wayne, 1984).

Tabla II.5. Resultado de la tinción de las improntas con auramina fenolada y cultivo de muestras con lesiones compatibles con tuberculosis de los 9 animales (4 perros y 5 gatos).

Animal	Muestra	A ^a	L ^b	Cultivo ^c e identificación		Diagnóstico ^d
				TT	HPC	
Perro 1	hígado	+++	+	LJ (30 d) <i>M. tuberculosis</i>	NR	tuberculosis
	pleura y peritoneo	++	+	LJ (30 d) <i>M. tuberculosis</i>	NR	
	pulmón	+	d	-	NR	
	riñón	++	+	C, CS, LJ (35 d) <i>M. tuberculosis</i>	NR	
	ganglio linfático	+	+	C, LJ (30 d) <i>M. tuberculosis</i>	NR	
	piel	+	+	C (30 d) <i>M. tuberculosis</i>	NR	
Perro 2	exudado pleural	-	d	-	-	nocardiosis
Perro 3	Pulmón	-	d	-	-	carcinoma
	ganglio linfático	-	d	-	-	
Perro 4	hígado	-	d	-	-	carcinoma
Gato 1	pulmón	+	d	C, LJ (45 d) <i>M. bovis</i>	NR	tuberculosis
	ganglio linfático	+	d	C (45 d) <i>M. bovis</i>	NR	
Gato 2	pulmón	-	d	-	-	P.I.F.
Gato 3	restos de órganos	+++	+	C (32 d) LJ (40 d) <i>M. tuberculosis</i>	C, LJ (26d) <i>M. tuberculosis</i>	tuberculosis
	pulmón	+++	+	C (26 d) LJ (50 d) <i>M. tuberculosis</i>	C (20 d) LJ (26 d) <i>M. tuberculosis</i>	
Gato 4	ganglios retrofaríngeos	+++	+	C, LJ (50 d) <i>M. tuberculosis</i>	C (20 d) LJ (50 d) <i>M. tuberculosis</i>	tuberculosis
Gato 5	pulmón	+++	+	NR	C, LJ (32 d) <i>M. bovis</i>	tuberculosis

^a Tinción de las improntas con auramina fenolada^b Existencia de lesiones sospechosas de tuberculosis; d dudosa^c Cultivo en medios específicos (C, Coletsos; CS, Coletsos selectivo; LJ, Löwenstein-Jensen) para micobacterias después de la descontaminación (TT, Tacquet y Tison; HPC, cloruro de hexadecilpiridinio). Días necesarios para la obtención de colonias visibles entre paréntesis. NR, no realizado^d Diagnóstico definitivo de acuerdo con los resultados bacteriológicos e histopatológicos (realizados en el Departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de Madrid)

Tabla II.6. Resultado del cultivo y de PCR de las muestras de 9 animales (4 perros y 5 gatos) sospechosos de padecer tuberculosis.

Animal	Muestra	Cultivo ^a e identificación	PCR ^b			Diagnóstico ^c
			IS6110	ARNr 16S	MPB70	
Perro 1	hígado	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	tuberculosis
	pleura y peritoneo	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	
	pulmón	-	-	-	-	
	riñón	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	
	ganglio linfático	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	
	piel	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	
Perro 2	exudado pleural	-	-	-	-	nocardiosis
Perro 3	Pulmón	-	-	-	-	carcinoma
	ganglio linfático	-	-	-	-	
Perro 4	hígado	-	-	-	-	carcinoma
Gato 1	pulmón	<i>M. bovis</i>	+	+	+	tuberculosis
	ganglio linfático	<i>M. bovis</i>	+	+	+	
Gato 2	pulmón	-	-	-	-	P.I.F.
Gato 3	restos de órganos	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	tuberculosis
Gato 4	pulmón	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	tuberculosis
	ganglios	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	
	retrofaríngeos					
Gato 5	pulmón	<i>M. bovis</i>	NR	+	+	tuberculosis

^a Cultivo en medios específicos para micobacterias después de la descontaminación

^b Visualización de los productos de la amplificación del ADN extraído de la muestra, en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio

^c Diagnóstico definitivo de acuerdo con los resultados bacteriológicos e histopatológicos (realizados en el Departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de Madrid)

NR: No realizado

3.4. DIAGNÓSTICO POR PCR DE LAS MUESTRAS DE AVES

Las muestras tisulares aviares mostraron una gran cantidad de bacilos ácido-alcohol resistentes. Las muestras de las gallinas, la perdiz y el buho pudieron ser cultivadas en medios rutinarios, prefiriendo el medio Middlebrook 7H11 para el crecimiento. El tiempo necesario para el cultivo fue de cuatro a cinco semanas. La amplificación mediante PCR del ADN

extraído directamente de las muestras permitió la identificación de *M. avium* en dos días (Figura II.11). Todas las pruebas realizadas en las heces de los nidos de cría de las águilas fueron negativas.

Aunque se detectaron abundantes bacilos ácido-alcohol resistentes en la tinción directa de las improntas de las muestras de los canarios, de la amazona y del guacamayo, el cultivo fue negativo en los medios convencionales utilizados en nuestro laboratorio. Si se obtuvo crecimiento de la muestra del guacamayo al cultivar ésta en el medio 7H9 enriquecido con OADC w/WR 1339 (Difco Laboratories), 1g/l hidrolizado pancreático de caseína y 4 g/l de piruvato sódico. Tras la extracción del ADN y la amplificación con los iniciadores dirigidos al gen que codifica el ARNr 16S, una banda de 1.030 p.b. confirmó que los bacilos pertenecían al género *Mycobacterium* (Figura II.12). Sin embargo, no se amplificaron los fragmentos específicos de *M. avium* y *M. intracellulare*, descartando estas micobacterias como origen de la enfermedad. La determinación de la secuencia amplificada por PCR identificó al agente causal como *M. genavense*.

Tabla II.7. Resultados del análisis bacteriológico y del PCR directo de las muestras aviares.

Caso	Tinción de auramina	Cultivo	PCR directo ¹ de las muestras	
			Género	Especie ²
Gallinas 1	+	+ 4 semanas	+	<i>M. avium</i>
Gallinas 2	+	+ 5 semanas	+	<i>M. avium</i>
Perdiz	+	+ 4 semanas	+	<i>M. avium</i>
Azor	+	-	+	<i>M. avium</i>
Buho	+	+ 5 semanas	+	<i>M. avium</i>
Águila imperial	-	-	-	-
Canarios ⁴	+	-	+ <i>M. genavense</i> ³	-
Amazona	+	-	+ <i>M. genavense</i> ³	-
Guacamayo	+	+ ⁵	+ <i>M. genavense</i> ³	-

¹ Producto de la amplificación detectado en gel de agarosa

² Identificación de *M. avium* o *M. intracellulare*

³ Identificación mediante la secuenciación del producto de PCR específico de género

⁴ Resultados publicados (Ramis et ál, 1996)

⁵ Cultivo en el medio 7H9 enriquecido con OADC w/WR (Difco)

3.5. PCR NESTED

Las reacciones con las dos parejas de oligonucleótidos iniciales no fueron satisfactorias. La amplificación con IP-A e IP-B producía una banda de 202 p.b. muy débil, que aparecía incluso en los tubos inoculados con *M. avium* y *M. intracellulare*. La amplificación con NP-F y NP-R generaba un producto muy débil y de un tamaño sensiblemente mayor del esperado.

Los tubos con la combinación de los iniciadores se prepararon para averiguar qué iniciador causaba el error. TB1-F y TB1-R con hibridación a 61°C generaron un producto de 372 p.b.. IP-A e IP-B con hibridación a 61°C produjeron una banda muy débil, menor a la anterior. A 61°C, NP-F y NP-R no produjeron bandas; pero a 50°C apareció un producto muy débil y de gran tamaño. Tanto a 50 como a 61°C, el producto de NP-F e IP-B eran muy débil y mayor de 372 p.b. NP-F y TB1-R con hibridación a 61 y a 50°C generaron un producto fuerte y menor de 372 p.b. Sin embargo NP-R y TB1-F con hibridación a 61°C no originó ninguna banda, ni tampoco la amplificación con NP-R e IP-A a 61 y a 50°C. Según estos resultados puede deducirse una hibridación inespecífica de los iniciadores IP-B y NP-R en la zona del genoma exterior al iniciador TB1-R, por lo que se produce un fragmento mayor, principalmente al utilizar una temperatura de hibridación baja y poco específica. Se sustituyó la secuencia del iniciador de la cadena 3' a 5'.

En la optimización de las condiciones de la reacción con NP-F y NP-R2, el producto de mayor intensidad se consiguió al utilizar 30 ng de cada iniciador y 1 mM de $MgCl_2$. En las evaluaciones en paralelo de la sensibilidad de ambas reacciones de PCR, tanto TB-1 como NP-FR2 detectaron las diluciones 10^{-4} a 10^{-5} , el PCR combinado (primero TB-1 y después NP-FR2) pudo detectar la dilución 10^{-6} . Al inocular ADN purificado TB-1 y NP-FR2 pudieron detectar 5×10^{-13} g/ul, mientras que el Nested-PCR pudo detectar entre 10^{-15} y 10^{-18} g/ul. Sin embargo, en la comprobación de la reproducibilidad de los resultados pudimos observar que este método es fácilmente susceptible de contaminación, a pesar de respetar unas estrictas condiciones de trabajo.

3.6. MODIFICACIÓN DEL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN

En la amplificación directa de los sobrenadantes y sedimentos descontaminados no se obtuvo ningún resultado, probablemente debido a una inhibición de la reacción por parte del SDS, NaOH y HPC. Una vez purificados, se detectó ADN en el sedimento de las suspensiones 10^{-1} a 10^{-4} y en el sobrenadante de las 10^{-1} a 10^{-3} descontaminadas con NaOH-SDS, y en el sedimento de la 10^{-1} y sobrenadantes de 10^{-1} a 10^{-4} de las descontaminadas con HPC. En ausencia del efecto protector de tejido, ambos métodos de descontaminación rompen bacterias (que además se pueden perder en la centrifugación), este efecto es mucho mayor con el HPC, ya que apenas se detectan células en el sedimento. Sin embargo, el HPC es mucho menos letal y produce mejores resultados en el cultivo.

La inactivación durante 1 hora a 74°C reduce la eficacia aproximadamente 10 veces, ya que el sedimento fue positivo en el PCR hasta la dilución 10^{-3} , mientras que el sobrenadante fue positivo hasta la 10^{-4} . En el tratamiento con proteinasa K todos los sedimentos fueron negativos, y en los sobrenadantes se amplificaron el fragmento de género y la secuencia de la MPB70, indicando que la proteinasa K es efectiva en la rotura de las células y que el DNA pasa al sobrenadante. Tras la centrifugación a alta velocidad puede detectarse ADN tanto en el sedimento como en el sobrenadante de las diluciones 10^{-1} a 10^{-4} , es decir, en la centrifugación se pierden muchas bacterias. Al comparar las amplificaciones obtenidas antes y después de purificar con el sistema Wizard Minipreps DNA purification System (Promega) las diluciones 1/20 de las suspensiones de micobacterias observamos que el sistema de purificación permite detectar la suspensión inicial 10^{-3} (dilución $0,5 \times 10^{-4}$), mientras que directamente se detecta solamente hasta la suspensión 10^{-2} , pero muy débilmente.

En los homogeneizados sembrados con la suspensión 10^{-1} descontaminados con NaOH-SDS se detectan los productos amplificados de género (muy débil) y de complejo, en el homogeneizado descontaminado con HPC solamente la de complejo. En ambos aparece mucho fondo de ADN tisular. En los homogeneizados sembrados con la 10^{-2} se detecta el fragmento específico de complejo pero no el de género. El protocolo que incluyó aceite permitió detectar la banda de especie en la suspensión 10^{-2} .

De los siete métodos de extracción probados en los homogeneizados de las dos muestras clínicas, los que ofrecieron mejores resultados fueron los métodos 3 y 4, en los que se detectó únicamente el fragmento específico de complejo. En los métodos 1 y 5 apareció una débil banda en una de las muestras.

En la comparación de la sensibilidad obtenida en la reacción con los iniciadores IS41 e IS43, y en la reacción con los dirigidos al ADNr 16S y MPB70, se comprobó un ligero aumento de la sensibilidad con esta última. Los tubos de PCR que incluyen iniciadores para el fragmento de género y del MPB70 permitieron detectar hasta una dilución 10^{-5} (género), y 10^{-4} (MPB70).

3.7. EVALUACIÓN DEL NUEVO MÉTODO DE EXTRACCIÓN

Los métodos de extracción seleccionados se evaluaron en homogeneizados sembrados, así como en muestras clínicas (Figuras II.13 y II.14). En homogeneizados sembrados, los métodos inicial e intermedio permitieron detectar los sembrados con las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} . La intensidad de los productos de la amplificación del ADN extraído siguiendo el método intermedio fueron ligeramente más fuertes que los obtenidos con el método inicial, probablemente debido a que el tratamiento térmico produce la lisis de un porcentaje de las micobacterias presentes en la muestra, con la consecuente pérdida de ADN al centrifugar ésta y descartar el sobrenadante. La utilización del protocolo definitivo permitió detectar el homogeneizado sembrado con la dilución 10^{-4} . Esto representa una mayor sensibilidad de la técnica, ya que es capaz de detectar un número diez veces menor de *M. bovis* presentes en la muestra.

Posteriormente, estos protocolos de extracción se evaluaron en seis muestras clínicas seleccionadas, cuyo cultivo de *M. bovis* había sido positivo, y cinco de ellas microscopía directa positiva. Cinco de estas muestras fueron positivas mediante PCR con el método definitivo, mientras que los métodos inicial e intermedio detectaron solamente tres.

Como resultados de estos experimentos, se seleccionó el último método como el más

sensible y se utilizó para analizar 123 muestras tisulares más. Los resultados se desglosan en la tabla II.8. El método de extracción definitivo detectó el 90,6% de las muestras cultivo de *M. bovis* positivo, incluyendo 13 de 17 muestras (76,5%) negativas en la tinción. Siete de las diez muestras cultivo negativo y auramina positivo fueron positivas por PCR; estas siete muestras presentaron también lesiones. Las cuatro muestras cultivo y auramina negativo, pero PCR positivo, tenían lesiones y provenían de animales de rebaños infectados. Todas las muestras de animales de rebaños libres de la infección fueron cultivo, microscopía y PCR negativo.

Si las muestras cultivo y/o PCR positivo fuesen consideradas infectadas, el nivel de detección sería 89,7 y 91,6% respectivamente.

Tabla II.8. Resultados del análisis bacteriológico y PCR de 129 muestras tisulares.

Especie	Cultivo positivo		Cultivo negativo	
	Auramina +	Auramina -	Auramina +	Auramina -
Vacuno	63 (58) ^a	14 (11)	6 (3)	15 (0)
Caprino	8 (8)	3 (2)	4 (4)	8 (4)
Gatos, ciervos, jabalíes	8 (8)	-	-	-
Total	79 (74)	17 (13)	10 (7)	23 (4)

^a Resultados de PCR entre paréntesis

En todas estas muestras el fragmento de 1.030 p.b. específico del género *Mycobacterium* no aparece amplificado, a pesar de que si existe amplificación del fragmento del gen que codifica la MPB70 característica del complejo *M. tuberculosis* (de menor tamaño molecular).

El ADN extraído de 31 de estas muestras (22 cultivo positivo y 9 cultivo negativo) se amplificó en paralelo en dos reacciones para detectar el fragmento específico del género *Mycobacterium*, la primera reacción detecta las primeras 1030 p.b. del gen, y la segunda un fragmento de aproximadamente 520 p.b. en el extremo 3' del mismo gen. La amplificación del ADN con los iniciadores para el fragmento de 1.030 p.b. fue infructuosa. En 20 de 26

ADNs cuya amplificación del gen MPB70 había sido positiva se detectó amplificación del fragmento pequeño del gen para el ARNr 16S (77%); 16 fueron extraídos de muestras cultivo positivo, y 4 de muestras cultivo negativo. Este fragmento se detectó también en una de las 5 muestras cultivo negativo y en las que el PCR con iniciadores para la MPB70 no detectó ADN de micobacterias; esta muestra presentó lesiones atípicas.

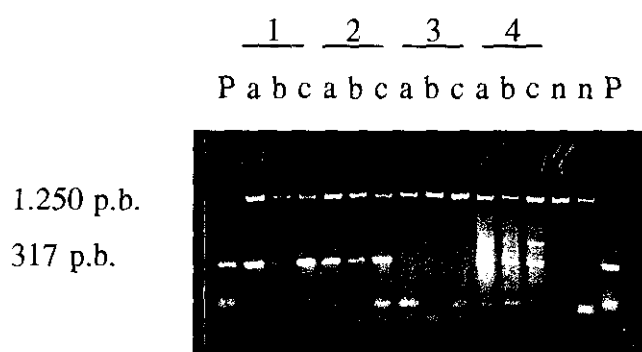


Figura II.4. Elección de la fracción del homogeneizado de tejido sobre la que realizar el protocolo de extracción del ADN. El ADN extraído se aplicó en los tubos de detección de la IS6110; una banda de 317 p.b. indica la presencia de ADN de microorganismos del complejo *M. tuberculosis*, una banda de 1.250 p.b. representa la amplificación del control positivo, por lo tanto que no está inhibida la reacción. Las calles p son tubos inoculados con ADN de *M. tuberculosis* utilizados como control positivo de la reacción. Las calles 1 a 12 muestran el resultado de la amplificación del ADN extraído; calles del grupo 1, del sedimento de la centrifugación a 12.000 r.p.m. del homogeneizado descontaminado y no inactivado; calles del grupo 2, del sedimento de la centrifugación del homogeneizado descontaminado e inactivado; calles del grupo 3, del sedimento de la centrifugación del homogeneizado no descontaminado e inactivado; calles del grupo 4, del sobrenadante de la centrifugación del homogeneizado descontaminado e inactivado. La muestra utilizada para las calles b fue hígado del perro caso número 1. Las otras dos muestras, a (P4g) y c (P3p), provenían de vacuno y corresponden a pulmón y ganglio linfático, ambas cultivo positivo.



Figura II.5. Detección del ADN de las micobacterias en muestras clínicas. La calle S contiene el estándar de pesos moleculares Φ X174 DNA-*Hae*III (1358, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 y 72 p.b.) (Pharmacia); calle N, control negativo; calle P, amplificación de ADN de *M. tuberculosis* ATCC 25177; calles A a D, amplificación del ADN extraído de las muestras clínicas. Una banda de 1250 p.b. indica la amplificación del control interno. Una banda de 317 p.b. indica la presencia de ADN de microorganismos del complejo *M. tuberculosis*.

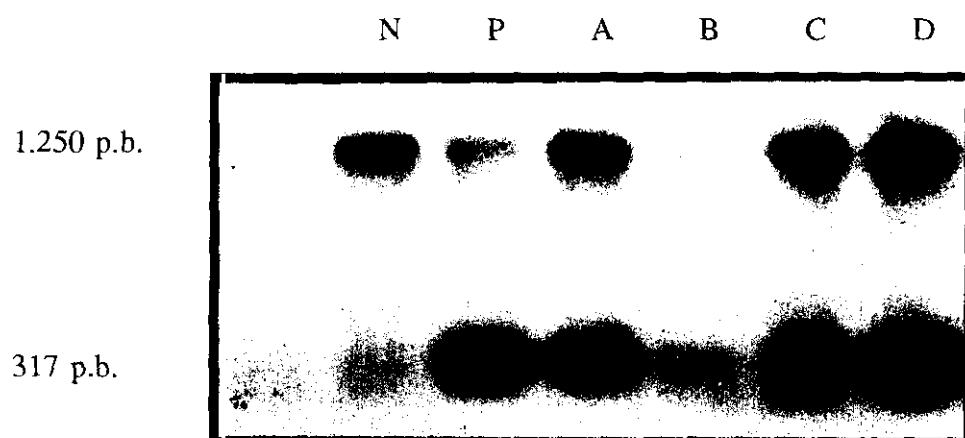


Figura II.6. Southern blot e hibridación de los productos amplificados con sondas dirigidas a la *IS6110* y al control positivo interno de la reacción. Calle N, control negativo; calle P, amplificación de ADN de *M. tuberculosis* ATCC 25177; calles A a D, amplificación del ADN extraído de las muestras clínicas.



Figura II.7. Determinación del ADN de micobacterias extraído a partir de tejidos de los perros y gatos, y amplificado mediante PCR con iniciadores dirigidos a la *IS6110*. Una banda de 317 p.b. indica la presencia de ADN de microorganismos pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*; una banda de 1.250 p.b. indica que la reacción no estaba inhibida. Calles S, ADN del fago Φ X174 digerido con la endonucleasa *Hae*III (Pharmacia) utilizado como estándar de pesos moleculares. Las calles P y N son los controles de extracción positivo y negativo; las calles A a D corresponden a los perros casos número 1 a 4, y las calles E a H a los gatos casos número 1 a 4.

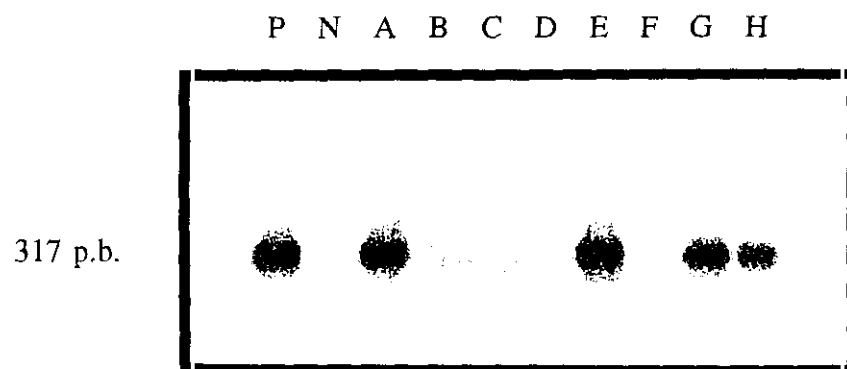


Figura II.8. Southern blotting e hibridación de los productos de la amplificación obtenidos con los iniciadores IS41 e IS43, con una sonda interna de la *IS6110*. Las zonas con color señalan hibridación específica. Las calles P y N muestran los controles de extracción positivo y negativo; las calles A a H, la hibridación con el ADN extraído directamente de las muestras de los animales y amplificado. Las calles A a D corresponden a los perros casos número 1 a 4; las calles E a H corresponden a los gatos casos número 1 a 4.

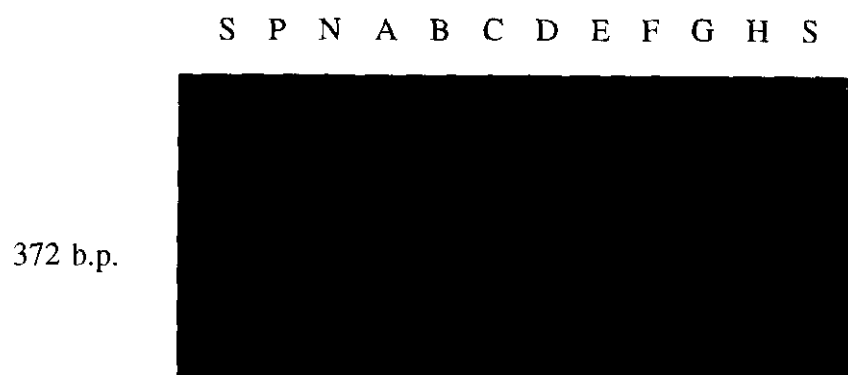


Figura II.9. Determinación del ADN de micobacterias extraído a partir de tejidos y amplificado mediante PCR con iniciadores dirigidos a la MPB70. Una banda de 372 p.b. indica la presencia de ADN de microorganismos pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*. Calles S, ADN del fago Φ X174 digerido con la endonucleasa *Hae*III (Pharmacia) utilizado como estándar de pesos moleculares. Las calles P y N son los controles de extracción positivo y negativo; las calles A a D corresponden a los perros casos número 1 a 4 y las calles E a H a los gatos casos número 1 a 4.

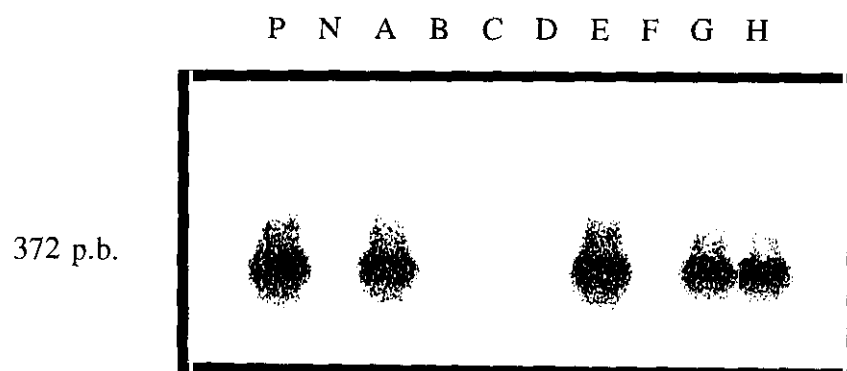


Figura II.10. Southern blotting e hibridación de los productos amplificados con una sonda para MPB70. Las zonas con color señalan hibridación específica. Las calles P y N muestran los controles de extracción positivo y negativo; las calles A a H, la hibridación con el ADN extraído directamente de las muestras de los animales y amplificado. Las calles A a D corresponden a los perros casos número 1 a 4; las calles F a H corresponden a los gatos casos número 1 a 4.

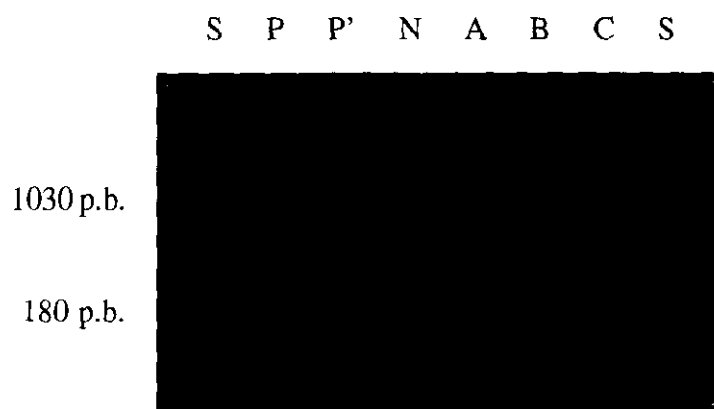


Figura II.11. Determinación del ADN de micobacterias en tejidos aviares por amplificación del gen que codifica el ARNr 16S, específico del género *Mycobacterium* (1.030 p.b.), y del fragmento específico de *M. avium* (180 p.b.). Calles S, 100 b.p. ladder DNA (Pharmacia); calle P, ADN de *M. bovis*; calle P', ADN de *M. avium*; calle N, control negativo; calles A y B, amplificación de ADN extraído de tejido hepático de una gallina y de un azor; calle C, amplificación de ADN extraído del granuloma cutáneo de un Amazona.

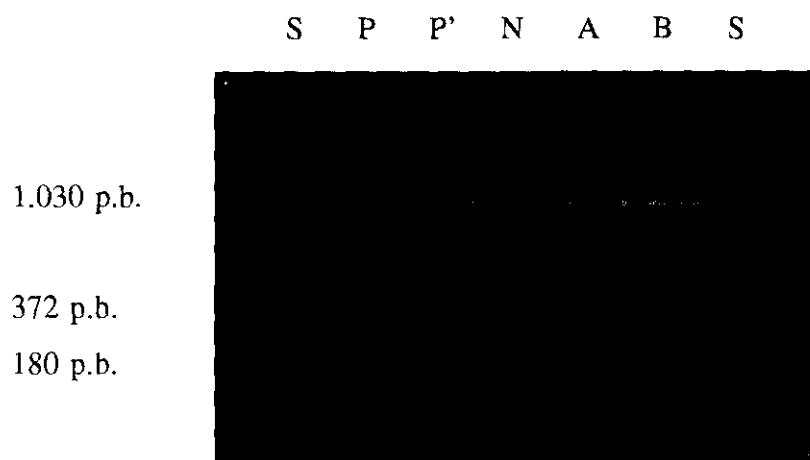


Figura II.12. Determinación del ADN de micobacterias en tejidos aviares por amplificación del gen que codifica el ARNr 16S, específico del género *Mycobacterium* (1.030 p.b.), del fragmento específico de *M. avium* (180 p.b.) y de la MPB70, específica del complejo *M. tuberculosis* (372 p.b.). Calles S, 100 b.p. ladder DNA (Pharmacia); calle P, ADN de *M. bovis*; calle P', ADN de *M. avium*, calle N, control negativo; calles A y B, amplificación del ADN extraído de las muestras de los canarios.

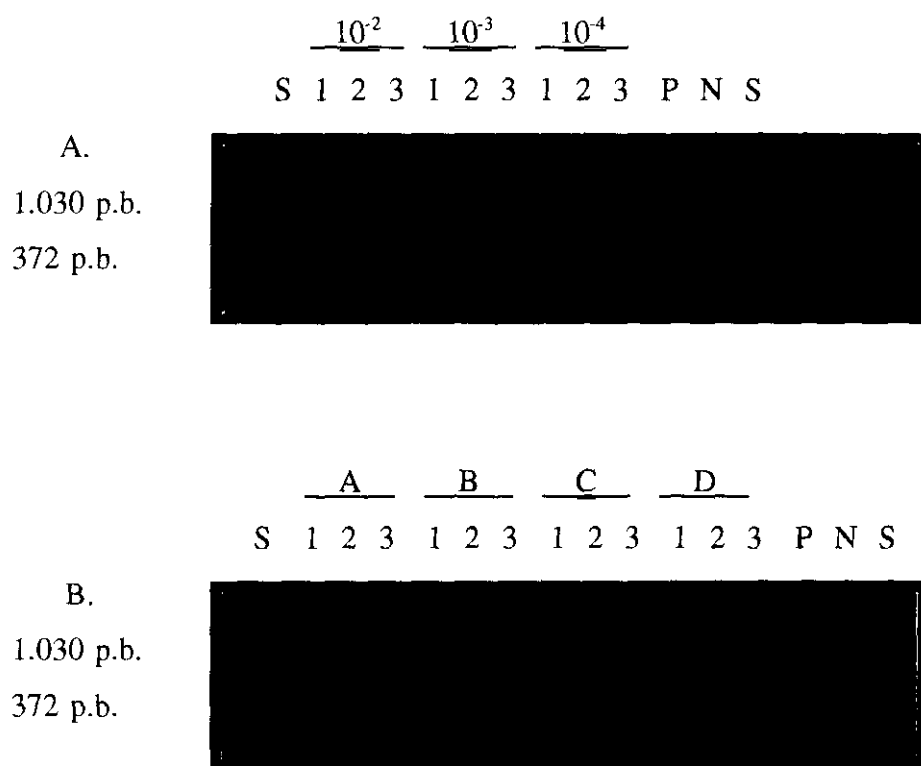


Figura II.13. Determinación de ADN de *M. bovis* DNA por PCR. Calle S, 100 base-pair ladder (Pharmacia) utilizado como estándar de pesos moleculares; calle P, control positivo; calle N, control negativo. Una banda de 372 p.b. indica la presencia de ADN de microorganismos del complejo *M. tuberculosis*. Una banda de 1.030 p.b. indica ADN de organismos del género *Mycobacterium*.

A. Amplificación del ADN extraído de los homogeneizados sembrados con las diluciones 10⁻², 10⁻³ and 10⁻⁴ de *M. bovis*. Calles 1, protocolo inicial; calles 2, intermedio; calles 3, definitivo.

B. Amplificación de ADN preparado a partir de muestras tisulares (A, B, C y D) utilizando los tres protocolos de extracción (1, inicial; 2, intermedio; 3, definitivo).

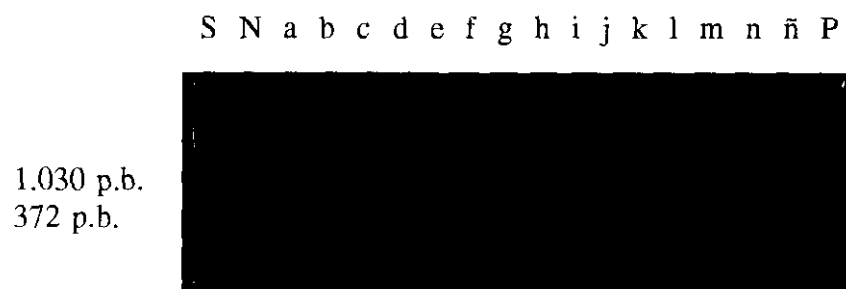


Figura II.14. Detección de ADN de micobacterias extraído de muestras clínicas y amplificado con iniciadores dirigidos a los genes que codifican el ARN 16S (1.030 p.b.) y la MPB70 (372 p.b.). Las calles S contienen el marcador de pesos moleculares 100 b.p. ladder (Pharmacia). Calle N, control negativo de la reacción; Calle P, control positivo inoculado con la dilución 1/100 de una suspensión de *M. bovis*. Las calles a a ñ, amplificación del ADN extraído de muestras clínicas utilizando el protocolo definitivo.

4. DISCUSIÓN

El riesgo que las infecciones por micobacterias suponen para las personas y los animales acentúa la necesidad de una identificación rápida del agente etiológico.

Se han desarrollado numerosos estudios para detectar micobacterias con la técnica de la PCR, pero pocos estudios han analizado muestras tisulares, especialmente de animales. Muchos ensayos de detección de micobacterias han demostrado su utilidad en esputos y muestras líquidas (orinas, líquido cefaloraquídeo, pleural) proveniente de seres humanos que a menudo contienen un gran número de bacilos. Estos trabajos han descrito condiciones de lisis por sonicación, calentamiento de 55 a 100°C, tratamientos con detergentes, NaOH, proteasas, lisozima, o de congelación-descongelación (Brisson-Nöel et ál, 1989; DeWitt et ál, 1990; Hermans et ál, 1990; Eisenach et ál, 1991; Plikaytis et ál, 1991; Sritharin et ál, 1991; Savic et ál, 1992), generalmente seguidos de una extracción fenol-cloroformo para purificar el ADN. Para la detección directa de *M. tuberculosis* en muestras, el PCR es más sensible que los métodos de cultivo tradicionales (Brisson-Nöel et ál, 1989; Pao et ál, 1990; Cousins et ál, 1992).

Aunque teóricamente el PCR puede detectar 1 fentogramo (fg) de ADN purificado el nivel de detección disminuye progresivamente al hacerse más compleja la muestra, como en el caso de los tejidos, ya que son más difíciles de procesar y la extracción del ADN de las micobacterias es más complicada. Este descenso en la sensibilidad puede estar causado por varios factores: (a) fallo en la extracción de microorganismos del complejo *M. tuberculosis* u otras micobacterias a partir del tejido, porque a menudo son patógenos intracelulares, siendo laboriosa su purificación a partir de las muestras clínicas, (b) un fallo en la extracción del ADN de estos microorganismos ya que la estructura y la impermeabilidad de las paredes celulares de las micobacterias hace que su lisis sea muy difícil, y (c) presencia de inhibidores de la reacción de PCR. Los compuestos de los tejidos, tales como la hemoglobina (Mercier et ál, 1990), pueden inhibir la reacción de amplificación, por lo que deben ser eliminados antes del proceso de amplificación. Además, algunos autores han descrito que las muestras de tejidos producen más bandas inespecíficas que las suspensiones (Wards et ál, 1995), probablemente debido a la gran cantidad de ADN eucariota de la muestra. Este ADN celular

puede interferir en la reacción de PCR y producir manchas (*smears*) en el gel de agarosa que enmascaran el resultado.

El sistema de detección descrito permite la identificación rápida y sensible de microorganismos de los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium-intracellulare*, cumpliendo los criterios necesarios; (1) eficiente rotura del tejido para provocar la liberación de las micobacterias, (2) lisis de estos microorganismos para obtener sus ácidos nucleicos, (3) purificación del ADN, eliminando sustancias inhibitoras y (4) utilización de oligonucleótidos específicos para los microorganismos a determinar.

Durante el desarrollo del método de extracción inicial se comprobó que las etapas de descontaminación del homogeneizado de la muestra con NaOH y SDS, el lavado del sedimento y el tratamiento con proteinasa K eran esenciales para la obtención del ADN. La purificación de este ADN con Wizard Minipreps DNA Purification System (Promega) era una forma rápida de eliminar inhibidores.

Sin embargo, la compleja estructura de los tejidos, la contaminación con el ADN eucariota y la presencia de los restos tisulares producían una disminución de la sensibilidad que afectaba especialmente a las muestras con un bajo número de bacilos. Con el método de extracción inicial pudo identificarse la infección con micobacterias del complejo *M. tuberculosis* en el perro y los gatos, y con *M. avium* o *M. genavense* en las aves. Sin embargo, detectó solamente el 71,4% de las muestras de ganado vacuno que fueron confirmadas mediante cultivo.

Con el objetivo de incrementar la sensibilidad del diagnóstico se modificó la técnica inicial de extracción del ADN de las micobacterias a partir de las muestras tisulares. Los pasos en los que se produce una pérdida de ADN se estudiaron en diluciones decimales de una suspensión de micobacterias. Para evaluar su capacidad de detección y el efecto de las sustancias tisulares, los nuevos protocolos se ensayaron inicialmente en homogeneizados sembrados con alícuotas de diluciones bacterianas. La evaluación definitiva se llevó a cabo en tejidos naturalmente infectados, ya que la localización intracelular de las micobacterias

puede afectar al método.

El protocolo definitivo de extracción del ADN a partir de los tejidos y la posterior amplificación permitieron la detección del 90,6% de las muestras confirmadas por cultivo.

La combinación de las sustancias descontaminantes NaOH y SDS, utilizadas en el método de Tacquet y Tison, son efectivos no solamente en la descontaminación de la muestra, sino también como primer paso en el protocolo de extracción de las micobacterias porque producen lisis del tejido, liberando los microorganismos y eliminando al medio sustancias tisulares. Como pudimos comprobar en la elección de la fracción de homogeneizado y en la evaluación de las pérdidas de ADN, esta descontaminación causa también la destrucción de una parte de las micobacterias contenidas en la muestra; sin embargo, es el método de elección por su acción sobre el tejido. La posterior centrifugación a 3.500 r.p.m., aunque puede perder bacterias, elimina sustancias tisulares en el sobrenadante. Es además muy práctico poder realizar dos alícuotas en paralelo con el mismo tratamiento, una para el cultivo y otra para la extracción del ADN.

El tratamiento de 75°C durante 1 hora de este sedimento, realizado en un baño de agua, inactiva las micobacterias, haciendo más seguro el trabajo en el laboratorio. Sin embargo, provoca la ruptura de parte de las micobacterias, y asociada a la posterior centrifugación, produce una pérdida de ADN micobacteriano y por lo tanto, disminuye la sensibilidad. La temperatura de pasteurización mata las micobacterias, aunque la sensibilidad a la temperatura varía según la especie y el tiempo de tratamiento. La temperatura necesaria depende del volumen, de la densidad de microorganismos, del tamaño de los agregados y de la presencia de otros productos; por ejemplo, el desinfectante tiene efecto sinergista (Zwadyk y et ál, 1994). Esta inactivación solo es efectiva si se realiza en un baño de agua. La subsiguiente centrifugación a alta velocidad y el lavado de los sedimentos eliminan productos celulares del tejido roto en el tratamiento térmico, así como ADN eucariota y restos de las sustancias descontaminantes (NaOH y SDS) que inhiben la reacción de PCR.

La digestión con proteinasa K disgrega los restos de tejido y rompe las micobacterias.

Sin embargo, y a pesar de la digestión con esta enzima, algunas veces quedan restos de material tisular conglomerado. La lisis del tejido es más completa al utilizar lisozima y una combinación de SDS y proteinasa K. El posterior tratamiento a 100°C durante 5 minutos tiene por principal objetivo desnaturalizar la proteinasa K para evitar que pudiese afectar a la polimerasa, además permitiría la rotura de las últimas micobacterias que, aunque inviables, hubiesen resistido íntegras.

La introducción en la extracción del CTAB, con capacidad para unir proteínas y polisacáridos, incrementa la eliminación de sustancias inhibitoras. La posterior purificación del ADN con Wizard Minipreps DNA Purification System (Promega) es suficiente, evitando los pasos tradicionales de isopropanol y etanol, y recupera ADN, a la vez de ser más rápida y cómoda.

Esta técnica de extracción del ADN puede igualmente aplicarse para obtener un diagnóstico cuando las muestras estén en condiciones que impliquen una pérdida en la viabilidad de las micobacterias, y por lo tanto serían negativas en el cultivo; por ejemplo, muestras mal conservadas, congeladas y descongeladas varias veces, mantenidas a temperatura ambiente mucho tiempo, o cuando las micobacterias hayan sido destruidas en el proceso de descontaminación necesario para su cultivo en medios tradicionales (Wilton et ál, 1992).

La utilización de tres parejas de iniciadores incrementa las posibilidades de identificación. A pesar del diferente número de copias en que están presentes, no se encontró diferencia entre la sensibilidad del PCR dirigido a la detección de la IS6110 y la MPB70 para identificar micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*. Al amplificar 5 µl de una dilución decimal preparada a partir de una suspensión de *M. bovis* equivalente al número 5 de MacFarland e inactivada a 100°C durante 10 minutos, para comparar la detección de MPB70 y la IS6110, ambas pruebas amplificaron hasta la 10⁻⁴. La reciente descripción de algunas cepas de *M. tuberculosis* carentes de la IS6110 en países de Asia y África, aconsejan la utilización de al menos otra prueba para detectar el complejo *M. tuberculosis* (Van Soolingen et ál, 1994).

El empleo de los iniciadores para el gen que codifica el ARNr 16S permite reconocer la presencia de microorganismos del género *Mycobacterium*. En caso de que las otras 2 reacciones de PCR sean negativas se puede considerar que la micobacteria involucrada en el proceso no pertenece al complejo *M. tuberculosis* ni a *M. avium-intracellulare* y se trate de una atípica. La secuenciación del fragmento amplificado específico del género *Mycobacterium* permite la identificación del agente etiológico.

Desafortunadamente, la amplificación del fragmento de 1.030 p.b. específico de género no fue constante, estando relacionada con el método de extracción y el número de bacilos presentes en la muestra. En general, si la carga bacteriana es alta (como en el caso de micobacteriosis aviares y algunos animales de compañía) aparece el fragmento independientemente del método de extracción utilizado. Cuando el número de bacilos es escaso este fragmento no se amplifica, especialmente si se ha utilizado el método de extracción definitivo. En la amplificación con iniciadores para los fragmentos específicos de género ARNr 16S y de complejo para la identificación de colonias de cultivos o en las diluciones de éstos no existe competencia, o de existir variaciones (según lotes de tubos) apenas varía más de una dilución generalmente a favor del fragmento de género. Sin embargo, al amplificar ADN extraído de tejidos se amplifica solamente el fragmento de menor tamaño. Este hecho podría estar motivado por la cantidad inferior de ADN o por la presencia de alguna sustancia tisular que afecte la reacción, aunque no la inhiba.

Plikaytis et ál (1991) encontraron un efecto similar al amplificar ADN de *M. tuberculosis* en el mismo tubo para obtener un fragmento de 317 p.b. de la IS6110 y un fragmento de 576 p.b. del gen *groEL*. La banda de menor tamaño se amplificó eficientemente, mientras que la banda de mayor tamaño no era detectable porque se amplificó 20 veces menos que cuando lo hacía separadamente en otro tubo. En esta ocasión, los autores lo atribuyeron a la influencia relativa del número de copias. Los resultados de la prueba en paralelo del ADN extraído con iniciadores para el fragmento largo y para el corto del gen del ARNr 16S sugieren que en la extracción se produce una rotura del ADN.

Para evitar contaminaciones es necesario seguir unas severas normas en el laboratorio

(Kwok et ál, 1989; Wright et ál, 1990). La mayor fuente de contaminación potencial es el producto amplificado (*amplicon*) debido al elevado número de copias que se produce en una reacción de PCR. Cada tubo de PCR puede contener hasta 10^{12} copias de la secuencia diana; una gota de aerosol (10^{-6} µl) contiene hasta 10^5 copias (Kwok et ál, 1989; Persing, 1991). La forma más sencilla para evitar que estas copias amplificadas puedan contaminar las amplificaciones posteriores es utilizar laboratorios y material independientes en la preparación de tubos, inoculación de ADN y electroforesis de los productos.

Otras posibles fuentes de contaminación son las muestras clínicas que contienen un gran número de bacilos, produciendo contaminación cruzada entre las muestras (Wright et ál, 1990; Persing, 1991). Es aconsejable incluir siempre un control negativo de extracción, y procesar las muestras muy infectadas (por ejemplo, muestras aviares) de forma independiente. Simultáneamente es conveniente extremar el cuidado con el material de laboratorio. Durante este estudio no se detectaron falsos positivos; los controles negativos procesados en cada lote de muestras e incorporados en cada lote de tubos no detectaron ADN contaminante. Además se utilizaron condiciones de reacción deliberadamente estrictas respecto a las temperaturas de hibridación altas (60°C para el fragmento específico de género y la MPB70, 68°C para la IS6110) y baja concentración de enzima para minimizar una posible reacción cruzada con otras especies que pudieran estar incluídas en la muestra. La especificidad de los fragmentos de amplificación se confirmó mediante Southern blot.

El PCR nested tiene una sensibilidad muy superior a una PCR sencilla (Plikaytis et ál, 1990; Pierre et ál, 1991; Miyazaki et ál, 1993). Teóricamente esta reacción incrementa la especificidad ya que la segunda amplificación requiere la hibridación de los iniciadores con el fragmento amplificado. La reacción en dos pasos desarrollada permitió incrementar la sensibilidad del método, sin embargo, es fácilmente susceptible de contaminación.

El rendimiento de la PCR en muestras clínicas puede estar limitado por la presencia de inhibidores, originando hasta un 20% de falsos negativos (Fauville-Dufaux et ál, 1992; Soini et ál, 1992; Clarridge et ál, 1993; Nolte et ál, 1993). Esta inhibición es un importante obstáculo en la aplicación rutinaria del diagnóstico por PCR. En este estudio y debido a la

eficiencia de la eliminación de restos de material tisular del protocolo utilizado, el control interno incluido en los tubos de la IS6110 no detectó ninguna inhibición, obteniéndose a partir de todas las muestras la banda de 1.250 p.b. En algunos casos, cuando el ADN inoculado en los tubos estaba muy concentrado, se amplificó solamente la IS6110, no apareciendo la banda de control positivo. No obstante, puesto que si se visualizó la IS6110, es obvio que no existió inhibición.

El límite de la sensibilidad del PCR es controvertido. Los distintos grupos de autores han calculado la sensibilidad del PCR midiendo en un espectrofotómetro la concentración de una dilución de ADN purificado que es capaz de detectar, considerando que el tamaño del genoma de *M. bovis* es 2×10^9 Da (Baess, 1984; Imaeda, 1985) o $2,5 \times 10^9$ Da (Thierry et ál, 1990) para calcular el número de microorganismos correspondientes.

En diluciones de ADN purificado el nivel de detección con iniciadores dirigidos al gen que codifica la MPB70 es de 10 fg (equivalente a 2 genomas) (Wards et ál, 1995) a 25 fg de ADN de *M. bovis* (Cousins et ál, 1991). Con iniciadores para la secuencia IS6110 detecta entre 1 fg (Eisenach et ál, 1990; Wards et ál, 1995) y 10 fg (Thierry et ál, 1990). Al utilizar iniciadores dirigidos al fragmento de 1.030 p.b. específico de género, la amplificación de 10 pg de ADN es detectables en gel de agarosa (Böddinghaus et ál, 1990); esta sensibilidad puede aumentar 100 veces (0,1 fg) si los productos son detectados por hibridación (Böddinghaus et ál, 1990). Teniendo en cuenta el tamaño aproximado del genoma de las micobacterias, 0,1 fg equivale a aproximadamente el 2% del total de los ácidos nucleicos contenidos en una bacteria (Böddinghaus et ál, 1990).

La sensibilidad de la PCR disminuye cuando se trabaja en diluciones de cultivos, este método detecta de 10 a 100 células dependiendo de los iniciadores utilizados. En tejidos sembrados artificialmente con micobacterias el test es menos sensible, detecta una carga visible microscópicamente, de 2×10^3 a 5×10^3 /ml en total, lo que corresponde a un número aproximado de bacterias viables de 600 a 1500 UFC/ml (Wards et ál, 1995). Este dato es semejante al encontrado por Pattyn et ál, (1992) de 10^3 - 10^4 de *M. leprae*/g de tejido homogeneizado.

En realidad es muy difícil determinar el número de micobacterias presentes en cada dilución debido a la hidrofobicidad y la característica tendencia a formar agregados, por lo que puede no ser posible la correlación directa entre UFC y genomas de micobacterias. Por cada microorganismo vivo puede haber varios muertos que contribuyan a incrementar la sensibilidad aparente del PCR (Zwadyk et ál, 1994).

Aplicado en muestras clínicas, principalmente esputos, el PCR tiene una sensibilidad muy alta, según las diferentes publicaciones entre 79% (Shawar et ál, 1993), 80,6% (Veringa et ál, 1992), 87% (Forbes et ál, 1993), 92% (Buck et ál, 1992), 93,9% (Fauville-Dufaux et ál, 1992), 95% (Savic et ál, 1992) y 98% (Beige et ál, 1995) de las muestras confirmadas mediante cultivo. Sin embargo, los niveles de sensibilidad son cuestionables. En una prueba comparativa interlaboratorial se enviaron a siete laboratorios experimentados un grupo de muestras codificadas (Noordhoek et ál, 1993). Estas muestras estaban sembradas con diferentes cantidades de *M. bovis* BCG para ser diagnosticadas en cada centro por PCR con iniciadores dirigidos a la IS6110. Los resultados fueron sorprendentes; el 22% de las muestras control negativas fueron clasificadas como positivas. La capacidad para detectar 1.000 o 10.000 bacterias en los 200 µl de muestra dependió ampliamente de cada laboratorio; del 2 al 90% (la media fue 54%) para 1.000 bacterias, y del 20 al 100% (media 70%) para 10.000 bacterias (Noordhoek et ál, 1993).

La identificación con el método de extracción inicial permitió la detección del 71,4% del vacuno infectado. Las muestras de dos animales del grupo 1, diagnosticados como infectados en las campañas de erradicación mediante la intradermotuberculiización y el IFN-gamma, fueron negativas al ser cultivadas pero positivas en el diagnóstico mediante PCR. En la necropsia, estos animales presentaron lesiones compatibles con tuberculosis, y en la tinción directa de las muestras seleccionadas aparecieron bacilos ácido-alcohol resistentes. En una de estas muestras se cultivaron micobacterias de crecimiento rápido (no pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*). El PCR realizado a estas colonias fue negativo. Es posible que el sobrecrecimiento de estas colonias impidiese el crecimiento de *M. bovis* presentes en la muestra. El crecimiento de *M. bovis* es característicamente disgónico y lento en comparación con el de la mayoría de las micobacterias (incluyendo *M. tuberculosis*), por lo que en un

cultivo mixto no pueden ser detectados. Los agresivos métodos de descontaminación utilizados para eliminar la flora contaminante en las muestras tienen también efectos perjudiciales en *M. bovis*; el PCR permite detectar tanto las bacterias viables como las inviables, que sin embargo, no pueden ser detectadas en el cultivo.

Treinta animales del grupo 1 fueron cultivo y PCR negativo. Los resultados del cultivo y el PCR de 21 de los 30 animales del grupo 1, sin lesiones visibles y negativas en la tinción con auramina, sugiere que estos animales no estaban infectados, o bien que las muestras seleccionadas no fueron las adecuadas al presentar lesiones incipientes que no pudieron ser detectadas (Kantor et ál, 1987), una temprana exposición a las micobacterias, suficiente para causar sensibilización frente a los tests inmunológicos, pero no para producir lesiones (Duffield et ál, 1989). Los otros 9 animales, también cultivo y PCR negativo, presentaron lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis o tinciones con auraminas positivas, pero que no pudieron ser confirmadas por lo que se consideran falsos positivos. Este resultado es consistente con el hecho de que no todas las lesiones consideradas tuberculosis encontradas en el examen post-mortem tiene realmente este origen (Tammemagi et ál, 1973; Kantor et ál, 1987), aunque es imposible descartar una escasa sensibilidad del cultivo y del PCR en lesiones crónicas.

A pesar de que se ha prestado poca atención a la tuberculosis en los pequeños animales, esta enfermedad debe ser considerada como un peligro para la salud humana debido a su posible papel en la producción y mantenimiento de la enfermedad (Hawthorne et ál, 1957). Además, la tuberculosis en estos animales puede ser un revelador de la enfermedad humana, por lo que el diagnóstico de un caso de tuberculosis en un animal de compañía debe estar siempre seguido de una investigación epidemiológica completa, que incluya tanto a otros animales como a personas en contacto con el animal diagnosticado, y en todos los casos, de una revisión médica de los propietarios. También la identificación de casos de tuberculosis en humanos debería estar seguida de la evaluación clínica de los perros y gatos en contacto, como posibles reservorios, así como en caso de brotes de *M. bovis* en granjas.

Según varios autores (Hawthorne et ál, 1957; Isaac et ál, 1983; Greene, 1984; Clercx

et ál, 1992) la mayoría de los casos de tuberculosis felina están producidas por *M. bovis*. Sin embargo, en este estudio, *M. tuberculosis* fué aislado de 2 gatos. Esta reducción de la tuberculosis canina y felina producidas por *M. bovis* puede estar motivada por la creciente utilización de comidas comerciales preparadas para animales de compañía, y por la menor prevalencia de la tuberculosis bovina debido a las campañas de erradicación. Es aconsejable evitar la alimentación de estos animales con leche no pasteurizada y despojos crudos.

Las recientes modificaciones en las relaciones entre personas y animales han originado un cambio en el habitat de los perros y gatos, así como un contacto más estrecho con los seres humanos. Esta podría ser la razón de las cepas de *M. tuberculosis* aisladas de estos animales. En nuestro estudio, los propietarios del perro número 1 y del gato número 3 habían padecido tuberculosis antes del comienzo de la sintomatología de la enfermedad en los animales. El gato número 1, infectado con *M. bovis*, era alimentado esporádicamente con vísceras crudas adquiridas en una casquería, pudiendo ser éstas el origen de su infección. La fuente de la infección en los otros animales continúa siendo indeterminada.

Los principales signos clínicos que presentaron los perros y gatos fueron inespecíficos, y no proporcionaron un diagnóstico claro de la etiología de la enfermedad. Aunque los síntomas de los 9 animales fueron similares, cuatro estaban originados por otras causas infecciosas (nocardiosis, peritonitis infecciosa felina) o por tumores. Estos resultados ilustran la dificultad que encuentran los clínicos para el diagnóstico de esta enfermedad en los pequeños animales (Clercx et ál, 1992).

La extracción de ADN y su amplificación por PCR permite también la identificación de micobacterias en muestras aviares. Algunas micobacterias no son capaces de crecer en medios convencionales utilizados rutinariamente en los laboratorios; sin cultivo, la identificación bioquímica es imposible. Por consiguiente, el aislamiento y la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes asociados a micobacteriosis en las aves han sido a menudo infructuosos (Hoop et ál, 1993). La extracción directa de ADN de las micobacterias a partir del tejido lesionado, la amplificación específica mediante PCR, y la secuenciación del fragmento amplificado proporcionan un método rápido y definitivo para identificar estos

microorganismos. Esta secuenciación nos permitió identificar *M. genavense* en las muestras de varias aves. *M. genavense* (Böttger et ál, 1993) puede causar infección en personas inmunosuprimidas (Hirschel et ál, 1990; Böttger et ál, 1992; Nadal et ál, 1993; Tortoli et ál, 1994). Aunque no se conocen informes de esta transmisión, debe informarse a los propietarios de los animales de un potencial riesgo.

El método de extracción definitivo detectó el 90,6% de las muestras cuyo cultivo fue positivo. Esta sensibilidad es superior a la de la tinción con auramina (82,3%), permitiendo además la identificación de la especie involucrada. Las 11 muestras positivas en el diagnóstico por PCR, pero cuyo cultivo fue negativo presentaron lesiones y eran de animales pertenecientes a rebaños infectados.

Los resultados de este estudio indican que el método de extracción del ADN de las micobacterias a partir de muestras clínicas descritas y su amplificación por PCR puede ser utilizado para la detección directa de organismos de los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium-intracellulare* en muestras tisulares. Las principales ventajas son la reducción del tiempo necesario para el diagnóstico fiable a 2 o 3 días, frente a las 4 a 20 semanas requeridas para el aislamiento e identificación convencional utilizando los métodos tradicionales, y la posibilidad de detectar las micobacterias en muestras incluso cuando los microorganismos son inviables para el cultivo o cuando existe un sobrecrecimiento de otra bacteria.

***III. TIPIFICACIÓN DE CEPAS DEL
COMPLEJO *Mycobacterium tuberculosis*
MEDIANTE PCR CON INICIADORES
DE SECUENCIA ARBITRARIA***

Resumen

La amplificación del ADN mediante PCR con iniciadores de secuencia aleatoria (*Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD), permite una caracterización del genoma sin conocimiento previo de su secuencia. El objetivo de este trabajo fue el desarrollo y la evaluación de esta técnica para el estudio epidemiológico de cepas de *M. bovis* y bacilos del complejo *M. tuberculosis* aislados de focas, cuyos patrones de tipificación por REA y RFLP eran conocidos.

No se observó correlación entre los resultados obtenidos mediante RAPD y con el análisis por REA y RFLP. La principal limitación de esta técnica para su realización en varios laboratorios es la escasa reproducibilidad de los resultados, relacionada con las condiciones necesarias para la reacción (altas concentraciones de enzima, cloruro de magnesio y ADN, y baja temperatura de hibridación), por lo que solamente puede ser aplicada en grupos reducidos de cepas.

1. INTRODUCCIÓN

Los polimorfismos en el ADN pueden ser identificados sin conocimiento previo de la secuencia diana, amplificando segmentos del genoma al azar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR), utilizando oligonucleótidos iniciadores cuya secuencia está elegida arbitrariamente. Existen tres técnicas descritas: (1) *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Williams et ál, 1990), (2) *Arbitrary Primed PCR* (AP-PCR) (Welsh et ál, 1990), y (3) *DNA Amplification Fingerprinting* (DAF) (Caetano-Anolles et ál, 1991). Las diferencias entre éstas se basan en las condiciones de la reacción y en los métodos usados para el análisis (Tabla III.1).

Tabla III.1. Principales características de los métodos de amplificación arbitraria del ADN.

Técnica	Oligonucleótido iniciador	Número de ciclos y temperatura de hibridación	Detección de los fragmentos generados
RAPD	1 iniciador, de 10 nucleótidos	45 ciclos, 36°C	Electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.
AP-PCR	1 o 2 iniciadores, de 20 nucleótidos	32-42 ciclos, 40°C en los primeros ciclos, elevada en los siguientes	Electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio o electroforesis en gel de poliacrilamida.
DAF	1 o varios iniciadores, de 5 a 7 nucleótidos	30-45 ciclos, 30°C	Electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción de plata.

Se asume que en la reacción los iniciadores hibridarán en dos secuencias de las cadenas opuestas del ADN, dentro de los límites de distancia amplificable. El patrón de bandas (número y tamaño) obtenido dependerá, por lo tanto, del número de posibles puntos de hibridación presentes en el ADN diana (Newbury et ál, 1993). Los polimorfismos son el resultado de cambios en las bases nucleotídicas, inserciones o deleciones que alteran los sitios de unión de los iniciadores (Williams et ál, 1990; Clark et ál, 1993). La hibridación de los iniciadores arbitrarios puede ser resultado de la existencia de repeticiones inversas perfectas en el genoma, complementarias a la secuencia del iniciador, o a una hibridación imperfecta entre éste y el ADN diana, favorecida por la baja temperatura de hibridación (Welsh et ál, 1990). Esta segunda opción es la más probable en el caso de los procariotas, debido al pequeño tamaño de su genoma, aproximadamente 3×10^6 p.b. (Williams et ál, 1990). Después de los primeros ciclos de la reacción, los fragmentos generados contienen las

secuencias para una hibridación perfecta. La mayor parte de las sustituciones de un nucleótido en un iniciador modifican el patrón de bandas obtenido respecto al iniciador original (Williams et ál, 1990). La modificación de una base en el extremo 3' del iniciador afecta más a la generación de fragmentos que las realizadas en el 5' (Williams et ál, 1990; Caetano-Anolles et ál, 1992).

Los polimorfismos del ADN amplificado (*amplification fragment length polymorphisms*, AFLPs) con iniciadores de secuencia arbitraria son marcadores genéticos útiles, característicos de especie o de subespecie, que no están conservados entre especies relacionadas, aunque en determinados casos algunos productos generados tengan el mismo peso molecular (Welsh et ál, 1990; Williams et ál, 1990). Se han aplicado en el desarrollo de mapas genéticos (plantas y ratón) y en el estudio epidemiológico de patógenos de interés clínico, incluyendo *Trypanosoma congolense* (Majiwa et ál, 1993), *Aspergillus fumigatus* (Aufauvre-Brown et ál, 1992), *Histoplasma capsulatum* (Kersulyte et ál, 1992), *Candida albicans* (Lehmann et ál, 1992), *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus pyogenes* (Welsh et ál, 1990), *Legionella pneumophila* (Gómez-Lus et ál, 1993), *Proteus mirabilis* (Bingen et ál, 1993), *Listeria* spp. (Mazurier et ál, 1992; MacGowan et ál, 1993), *Helicobacter pylori* (Akopyanz et ál, 1992), *Haemophilus somnus* (Myers et ál, 1993), *Mycobacterium malmoeense* (Kauppinen et ál, 1994) y *M. tuberculosis* (Palittapongarnpim et ál, 1993; Linton et ál, 1994; Abed et ál, 1995).

El principal problema asociado con la técnica es la reproducibilidad de los resultados (Schierwater et ál, 1993). Puesto que las condiciones de la reacción afectan de forma significativa a los resultados obtenidos, la estandarización estricta de los protocolos y su cumplimiento riguroso son esenciales para superar los problemas potenciales de la técnica y asegurar la reproducibilidad entre diferentes amplificaciones (Ellsworth et ál, 1993).

El objetivo de este estudio fue la amplificación de ADN de cepas del complejo *M. tuberculosis* mediante PCR con iniciadores arbitrarios para su tipificación de una forma rápida y sencilla, evaluando la reproducibilidad de la técnica y su capacidad para caracterizar cepas relacionadas epidemiológicamente.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. CEPAS UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO

En este estudio se utilizaron dos cepas de referencia, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* AN5. Con el objeto de poder evaluar la tipificación mediante RAPD respecto a otras técnicas, se seleccionaron 17 cepas pertenecientes al complejo tuberculosis, 10 cepas de *M. bovis* y 5 aisladas de focas. Estas cepas habían sido previamente identificadas mediante pruebas bioquímicas y el test de la inmunoperoxidasa, y tipificadas por REA y RFLP en el Australian Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis (Agriculture, Western Australia).

Los diez aislados de *M. bovis* procedían de ganado bovino y caprino de los estados australianos de Western Australia (9) y Victoria (1). Ocho de las cepas de Western Australia estuvieron involucradas en un brote cuyo origen se consideró común. El análisis REA realizado con *Bst*EII, *Bcl*II, y *Pvu*II, y el RFLP con *Alu*I y la secuencia repetitiva PGRS fue idéntico en todos los aislados. La novena cepa (Squire 14120) mostraba un patrón diferente de RFLP y de REA con una de las tres enzimas. La cepa de Victoria tenía un patrón diferente (Cousins et ál, 1993).

Las otras cinco cepas pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* habían sido aisladas de pinnípedos con tuberculosis: las cepas 894 y 895 procedían de dos focas de un parque marino, 14109 y 14126 se aislaron de leones marinos encontrados muertos en Albany y en la bahía de Bremer respectivamente, y la cepa 92/1161T procedía de una foca de Tasmania. En la caracterización molecular por REA con *Bst*EII y *Bcl*II las cepas fueron iguales. Mediante RFLP con la enzima *Alu*I e hibridación con PGRS estas cepas eran idénticas entre sí, y claramente diferenciables de las bovinas; con *Pvu*II e hibridación con IS6110 la cepa obtenida del león marino de la bahía de Bremer fue ligeramente distinta (Cousins et ál, 1993).

2.2. PREPARACIÓN DEL ADN

Las cepas fueron subcultivadas en el medio E8, preparado con 11,5 g de TB Broth

Base (Difco Laboratories, Detroit, MI), 15 g de agar, 900 ml de agua destilada y 100 ml de homogeneizado de yema de huevo (10 g de yema de huevo, 6 g de Tween 80 y 1 g de carbón activado en 94 ml de agua). Se incubaron a 37°C hasta obtener un crecimiento abundante que se resuspendió en 20 ml de PBS, se inactivó a 75°C 40 min y se concentró por centrifugación.

La extracción del ADN se realizó a partir de aproximadamente 300 mg de células (peso húmedo). Las micobacterias se resuspendieron en 700 µl de TE buffer (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) más 100 µl de lisozima (20 mg/ml) e incubaron a 37°C durante 3 horas. Posteriormente se añadieron 100 µl de SDS (10%) y 100 µl de proteinasa K (1 mg/ml) e incubaron a 50°C aproximadamente 12 horas. Para eliminar los polisacáridos la suspensión se dividió en dos alícuotas de 0,6 ml y se trató con 100 µl de NaCl 5M y 80 µl de CTAB/NaCl (Wilson, 1988) manteniéndose a 65°C 10 minutos. La fracción que contiene el ADN se separó mediante adición de 0,6 ml de cloroformo-isoamiloalcohol (24:1), centrifugación a 6.500 r.p.m. 5 minutos y reextracción con fenol-cloroformo-isoamiloalcohol (25:24:1). El ADN fue precipitado con 0,4 ml de isopropanol a -20°C al menos 30 minutos, centrifugado a 6.500 r.p.m. y lavado dos veces con 1 ml de etanol al 70%. Se secó en estufa a 37°C y resuspendió en 100 µl de TE buffer.

La calidad del ADN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 1 hora a 80 voltios. La concentración se determinó en un espectrofotómetro midiendo la densidad óptica a 260 y 280 nm (la concentración de ADN en µg/µl es 10 veces la lectura de la densidad óptica a 260 nm de 5 µl de muestra diluidos en 995 µl de agua; la proporción de densidades ópticas 260/280 debe ser superior a 1,6-2 (Sambrook et ál, 1989).

2.3. ELECCIÓN DE INICIADORES QUE PRODUZCAN UN PERFIL DE BANDAS

2.3.1. Iniciadores utilizados

En principio se intentó la amplificación con 64 oligonucleótidos iniciadores (Tabla II.2). Los oligonucleótidos de los grupos OPA (20 oligos), OPB y OPC tienen 10 bases cuyas secuencias han sido aleatoriamente seleccionadas, con un contenido en G+C entre el 60 y el

70% y extremos no complementarios (Operon Technologies Inc., Alameda, CA). HLWL-74 y HLWL-85 son oligonucleótidos de 20 bases (Biotech Int., Perth, W.A.). IS-1 e IS-2, diseñados para las terminaciones de la secuencia de inserción IS6110, tienen 10 bases, y su contenido en G+C es 70 y 60%, respectivamente (Bresatec Std.).

2.3.2. La reacción de PCR

Para la preparación de la mezcla de la reacción se partió de unas condiciones estándar, con 5 µl de buffer 5x (335 mM Tris-HCl, pH 8.8 a 25°C, 83 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM dNTPs, 2,25% Triton-100 y 1 mg/ml de gelatina) (Biotech Int.), 2 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,1 µl Tth plus DNA polymerase 5,5 u/µl (0,5 unidades en cada reacción) (Biotech Int.), 1 µl de iniciador (Operon, 13,5-20 ng/µl; HLWL-74, 22 ng/µl; HLWL-85, 20,8 ng/µl; IS-1 e IS-2, 40 ng/µl) y 11,99 µl de agua ultrapura estéril para completar un volumen de 20 µl. Los tubos se cubrieron con 50 µl de aceite de parafina estéril y se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Estos tubos se probaron con 5 µl de ADN (5 ng/µl) de *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv, *M. bovis* AN5 y una cepa perteneciente al complejo *M. tuberculosis* aislada de una foca (cepa 894). Para confirmar que las bandas obtenidas correspondían a fragmentos amplificados del ADN diana, y no a una contaminación, se incluyeron también tubos control con 5 µl de agua ultrapura estéril.

La amplificación se llevó a cabo en un Corbett FTS-1 Thermal Cycler (Corbett Research, Mortlake, N.S.W.), con 45 ciclos de desnaturalización durante 1 minuto a 94°C (10 min en el primer ciclo), hibridación durante 1 min a 36°C, y elongación durante 2 min a 72°C (10 min en el último ciclo).

Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis a 80 V durante 1 hora en un gel de agarosa al 1,4% en TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8), se detectaron por tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se fotografiaron en un transiluminador con UV de longitud de onda media.

La extracción de ADN, la preparación de las mezclas de PCR y la detección de los productos amplificados se realizaron en laboratorios independientes.

2.4. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LA REACCIÓN

El patrón de bandas obtenido con PCR puede verse afectado por pequeños cambios en los parámetros de la reacción, tales como la temperatura de hibridación y la concentración de Mg^{2+} , polimerasa, ADN diana, e iniciadores. Para cada aplicación concreta se requiere el proceso de optimización de la reacción. Con el objeto de determinar la formulación que con los iniciadores seleccionados obtuviese mejores resultados se modificaron sucesivamente los componentes de la reacción, utilizando los mismos ciclos de temperatura (hibridación a 36°C). La detección de los productos amplificados se realizó en gel de agarosa al 1,4%.

2.4.1. Optimización de la concentración de ADN diana

Para comprobar el efecto de diferentes concentraciones de ADN (12,5, 25 y 50 ng), se prepararon tubos con 5 µl de buffer 5x (335 mM Tris-HCl, pH 8.8 a 25°C, 83 mM $(NH_4)_2SO_4$, 1 mM dNTPs, 2,25% Triton-100 y 1 mg/ml de gelatina) (Biotech Int.), 2 µl de $MgCl_2$ 25 mM (2 mM), 0,1 µl Tth plus DNA polymerase 5,5 u/µl (Biotech Int.), 1 µl de iniciador OPA-2 (16,5 ng/µl) u OPA-4 (17 ng/µl) y 11,99 µl de agua ultrapura estéril (volumen de 20 µl). Se inocularon con 5 µl de ADN de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* AN5 y del bacilo de las focas (cepa 894), cada uno de ellos a tres concentraciones diferentes: 2,5 ng/µl, 5 ng/µl y 10 ng/µl.

Tras haber optimizado la concentración de enzima y $MgCl_2$ se evaluó de nuevo la concentración de ADN con 12,5, 25, 50, 75, 100, 150 y 200 ng de ADN de *M. bovis* AN5 en cada reacción, en tubos preparados con 5 µl de buffer 5x (335 mM Tris-HCl, pH 8.8 a 25°C, 83 mM $(NH_4)_2SO_4$, 1 mM dNTPs, 2,25% Triton-100 y 1 mg/ml de gelatina) (Biotech Int.), 0,36 µl Tth plus DNA polymerase 5,5 u/µl (Biotech Int.), 1 µl de iniciador OPA-4 (15,5 ng/µl) o HLWL-85 (20,8 ng/µl), 2 o 3 µl de $MgCl_2$ 25 mM (según el iniciador utilizado), completando a 20 µl finales con agua ultrapura estéril. Se inocularon con 5 µl de ADN de *M.*

bovis AN5 2,5, 5, 10, 15, 20, 30 y 40 ng/μl.

2.4.2. Optimización de la concentración de polimerasa

Para optimizar la concentración de enzima que debe utilizarse en cada reacción para obtener el perfil de bandas más completo, se prepararon tubos con 5 μl de buffer 5x (335 mM Tris-HCl, pH 8.8 a 25°C, 83 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM dNTPs, 2,25% Triton-100 y 1 mg/ml de gelatina) (Biotech Int.), 1 μl de iniciador OPA-2 (16,5 ng/μl), OPA-4 (15,5 ng/μl) o HLWL-85 (20,8 ng/μl), 2 μl de MgCl₂ 25 mM, y concentraciones de Tth plus DNA polymerase 5,5 u/μl (Biotech Int.) ascendentes, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4 y 5 unidades/tubo, completando con agua ultrapura estéril hasta 20 μl. Estos tubos se inocularon con 5 μl de ADN de *M. bovis* AN5 (5 ng/μl).

2.4.3. Optimización de la concentración de cloruro de magnesio

Se prepararon tubos con 5 μl de buffer 5x (335 mM Tris-HCl, pH 8.8 a 25°C, 83 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM dNTPs, 2,25% Triton-100 y 1 mg/ml de gelatina) (Biotech Int.), 0,2 μl Tth plus DNA polymerase 5,5 u/μl (Biotech Int.), 1 μl de iniciador OPA-4 (15,5 ng/μl) y HLWL-85 (20,8 ng/μl) y varias concentraciones de cloruro de magnesio: 1, 1,5, 2, 3, 4 y 8 mM completando con agua ultrapura estéril el volumen de 20 μl. Para la amplificación se utilizó 25 ng de ADN de *M. bovis* AN5.

2.4.5. Optimización de la temperatura de hibridación

Tubos preparados con la fórmula inicial y los iniciadores OPA-2 y OPA-4, se inocularon con 5 μl de ADN de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* AN5 y del bacilo de las focas (894) con el mismo número de ciclos y temperaturas, pero modificando la temperatura hibridación a 34 y a 45°C. También se evaluó la utilidad de un programa corto de 35 ciclos, con desnaturalización a 94°C durante 5 segundos (10 minutos en el primero), hibridación a 36°C 30 segundos y elongación a 72°C durante 1 minuto (10 minutos en el último).

2.5. EVALUACIÓN DE LOS INICIADORES Y CONDICIONES SELECCIONADAS

Para los iniciadores OPA-2, OPA-4, OPA-13, OPB-7, OPB-10 y OPC-20 (Operon) la mezcla de la reacción fue 5 µl de buffer 5x (335 mM Tris-HCl, pH 8.8 a 25°C, 83 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM dNTPs, 2,25% Triton-100 y 1 mg/ml de gelatina) (Biotech Int.), 3 µl de MgCl₂ 25mM (3 mM), 0,36 µl Tth plus DNA polymerase 5,5 u/µl (2 unidades en cada reacción) (Biotech Int.), 1 µl de iniciador (14,5-18,5 ng/µl) equivalente a 5 pmoles/reacción, y 10,64 µl de agua ultrapura estéril para completar un volumen de 20 µl. Para los iniciadores HLWL-74 y HLWL-85 la mezcla de la reacción fue la misma, con 1 µl de iniciador (22 y 20.8 ng/µl respectivamente), y reduciendo la concentración de MgCl₂ a 2 µl (2 mM) y completando con 11,64 µl de agua. Ambas se cubrieron con 50 µl de aceite de parafina estéril.

Para comprobar la utilidad de los iniciadores en la diferenciación de especies y cepas del complejo *M. tuberculosis*, estos tubos se probaron con 5 µl de ADN (40 ng/µl) de *Mycobacterium tuberculosis* (cepa 942), *M. bovis* AN5 y una cepa perteneciente al complejo *M. tuberculosis* aislada de una foca (cepa 894), y 5 µl de agua ultrapura estéril como control negativo. Los iniciadores que habían puesto de manifiesto distintos perfiles se probaron con seis cepas de *M. bovis* aisladas de ganado vacuno de dos estados australianos y tres cepas de micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* aisladas de focas. En todos los casos la concentración de DNA fue 40 ng/ul.

La amplificación se llevó a cabo en un Corbett FTS-1 Thermal Cycler (Corbett Research) durante 45 ciclos de desnaturalización durante 1 min a 94°C (10 min en el primer ciclo), hibridación durante 1 min a 36°C, elongación durante 2 min a 72°C (10 min en el último ciclo). Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis a 80 V durante 1.3 horas en un gel de agarosa al 3% en TAE, se detectaron por tinción con bromuro de etidio y se fotografiaron en un transiluminador con UV de longitud de onda media.

2.6. REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS

Para evaluar la reproducibilidad de los resultados en dos diferentes termocicladores

se preparó un lote de tubos con los primers OPC-20, HLWL-74 y HLWL-85, se inoculó con el DNA y se amplificaron por duplicado y en paralelo, con el mismo programa en un Corbett FTS-1 Thermal Cycler y en un Corbett FTS-320 Thermal Sequencer (Corbett Research).

Para evaluar la estabilidad de estas reacciones se prepararon separadamente, siguiendo la formulación de las mezclas anteriores con los iniciadores OPC-20 y HLWL-85, dos lotes de tubos (1 y 2). El segundo lote se distribuyó en tres alícuotas (2a, 2b y 2c). Se inocularon estos tubos con 5 µl de DNA de las cepas 894, 895 y 92/1161T (40 ng/µl), y agua ultrapura estéril como control negativo usando el mismo programa de temperatura y en el mismo termociclador, en tres días: el primer día se inocularon y amplificaron los lotes 1 y 2a; el segundo día el lote 2b; y el tercer día el lote 2c.

2.7. ANÁLISIS RAPD CON LOS INICIADORES OPB-10, OPC-20 E IS-1 EN LA TIPIFICACIÓN DE CEPAS DEL COMPLEJO *M. tuberculosis*

Para comprobar la utilidad de los iniciadores OPB-10, OPC-20 e IS-1 en la caracterización de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* se utilizaron para amplificar 200 ng de ADN de cepas de diferentes orígenes, aisladas de focas y de ganado vacuno siguiendo las condiciones de la reacción ya descritas.

3. RESULTADOS

3.1. ELECCIÓN DE LOS INICIADORES Y REACCIÓN DE PCR

De los 64 iniciadores probados, solamente 17 originaron alguna banda al amplificar ADN de diferentes especies del complejo *M. tuberculosis*, aunque los resultados obtenidos con algunos no mostraron una aceptable discriminación entre especies (Figura III.1). Varios iniciadores, por ejemplo, OPA-1, OPA-9, OPA-10, produjeron tenues bandas (productos de amplificación) en sólo una cepa, y OPA-11, OPB-7 y OPC-5, mostraron bandas muy borrosas, por lo que su uso quedó descartado, así como el OPC-8 ya que la banda obtenida con el control negativo tenía el mismo tamaño que las amplificaciones de las cepas.

Los iniciadores seleccionados fueron HLWL74 y HLWL-85, los más variables; OPA-2, OPA-4, OPA-13, OPC-2 e IS-1, que presentaron bandas definidas del mismo tamaño en las tres especies; y OPA-3, OPB-10 y OPC-20, que amplificaron bandas claras en dos especies. La utilización combinada de los iniciadores OPA-1 con OPA-2, y OPA-2 con OPA-4 produjo fragmentos amplificados de menor nitidez que con los iniciadores OPA-2 y OPA-4 aisladamente.

Tabla III.2. Oligonucleótidos iniciadores utilizados y patrón de bandas obtenido.

Iniciador	Patrón de bandas obtenido	Secuencia (5' → 3')
OPA1-20	OPA-2, OPA-3, OPA-4 y OPA-13: bandas Restantes OPA: ninguna banda o bandas borrosas	OPA-2 TGC CGA GCT G OPA-3 AGT CAG CCA C OPA-4 AAT CGG GCT G OPA-13 CAG CAC CCA C
OPB1-20	OPB-10: bandas Restantes OPB: ninguna banda o bandas borrosas	OPB-10 CTG CTG GGA C
OPC1-20	OPC-2 y OPC-20: bandas Restantes OPC: ninguna banda o bandas borrosas	OPC-2 GTG AGG CGT C OPC-20 ACT TCG CCA C
HWLW-74	Bandas	
HLWL-81	Bandas	
IS-1	Bandas	GGC TGA GGT C
IS-2	Ninguna banda	ACC CCA TCC T

El número de productos de amplificación fue muy bajo en todos los casos, oscilando entre 1 y 4 fragmentos. A pesar de la secuencia aleatoria de los iniciadores, su contenido en G+C (próximo al del género *Mycobacterium*) y la baja temperatura de hibridación utilizada deberían haber facilitado la ampliación inespecífica de un mayor número de fragmentos. El pequeño tamaño del genoma de las micobacterias pudo ser el motivo de este reducido número de amplificaciones.

3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN

Después de la identificación de los iniciadores apropiados se llevó a cabo la optimización de la reacción respecto a las concentraciones de ADN diana, enzima, MgCl_2 y temperatura de hibridación manteniendo el resto de los parámetros constantes. La mayor calidad de los patrones de bandas se obtuvo con 2 unidades de enzima, 200 ng de ADN, y 2 o 3 mM MgCl_2 (dependiendo del iniciador).

El número de bandas y su resolución se vieron ligeramente influenciados por la concentración de enzima; a medida que la concentración aumentó de 0,5 a 2 unidades/reacción aparecieron nuevas bandas, pero con más unidades de enzima la reacción fué totalmente negativa (Figura III.2). Diferentes marcas de Taq polimerasa pueden originar diferentes patrones de bandas (Meunier et ál, 1993; Schierwater et ál, 1993), por lo que la optimización de la reacción de amplificación se realizó con una única fuente de enzima. También pueden existir variaciones entre lotes de enzima, por lo que incluimos controles en todas las reacciones. La concentración de MgCl_2 afectó también al resultado; el número de bandas aumentó conforme lo hizo el contenido en sales de 1 a 4 mM, seleccionándose como óptima la menor que produjo un patrón suficiente (Figura III.3).

En las condiciones iniciales probadas, las variaciones en la concentración de ADN, de 12,5 a 50 ng, no son detectables en los resultados, teniendo mucho mayor efecto la modificación de la concentración de enzima o Mg^{2+} . Una vez optimizadas los anteriores componentes de la reacción, la amplia variación de concentraciones de ADN utilizadas (de 12,5 a 200 ng) no alteraron sustancialmente los resultados, aunque se detectaron una o dos

bandas más al utilizar más ADN diana (Figura III.4). En todos los casos la habilidad de cuantificar con exactitud la concentración de ADN es esencial, por lo que la determinación se efectuó mediante espectrofotometría.

También se valoró el efecto de la variación de la temperatura de hibridación y la duración de las etapas de desnaturalización, hibridación y elongación en la generación de fragmentos. No se obtuvo ninguna ventaja de la reducción (34°C) o elevación (45°C) de la temperatura de hibridación, ya que no modificó el número de fragmentos amplificados pero los productos aparecían con menor definición. La utilización de etapas más cortas redujo el número de bandas.

3.3. EVALUACIÓN DE LOS INICIADORES SELECCIONADOS

Al evaluar los iniciadores seleccionados con las condiciones de la reacción óptima (Figuras III.5 y III.6), los iniciadores OPA-2, OPA-4, OPA-13 y OPB-7 no mostraron diferencias, o éstas fueron muy pequeñas, al comparar el patrón de bandas entre las tres especies del complejo *M. tuberculosis* amplificadas. Sin embargo, el OPB-10, OPC-20, HLWL-74 y HLWL-85 mostraron diferencias reconocibles entre las tres especies, por lo que se utilizaron para la caracterización de cepas de *M. bovis* y cepas aisladas de focas (Figura III.7). Los iniciadores OPC-20 y HLWL-85 fueron capaces de detectar polimorfismos entre estas cepas, sin embargo, algunos aislados de ganado vacuno y de pinnípedos presentaron fragmentos del mismo peso molecular. Los resultados con HLWL-74 fueron excesivamente variables, incluso dos tubos inoculados con dos diluciones de ADN de una misma cepa, produjeron perfiles de amplificación diferentes.

3.4. REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS

Al repetir las amplificaciones se encontraron algunas diferencias en el número y tamaño de las bandas. En las amplificaciones del mismo ADN, y en las mismas condiciones, los patrones de bandas producidos por los dos termocicladores fueron bastante diferentes. En el examen de las posibles alteraciones producidas en los resultados debidas a las variaciones

diarias en la realización de los tubos y en la amplificación, los perfiles obtenidos con el primer HLWL-85 fueron muy variables; los patrones de bandas variaron dependiendo de cada lote y de cada día, por lo que no se recomienda su utilización en la tipificación de cepas. En cambio, el primer OPC-20 fue más estable, produciendo los mismos patrones de bandas en cada cepa al realizar las amplificaciones por cuatriplicado (Figura III.8).

3.5. ANÁLISIS RAPD DE CEPAS DEL COMPLEJO *M. tuberculosis*

Para evaluar la utilidad de la técnica RAPD en la caracterización molecular y epidemiología de la tuberculosis se amplificó el ADN de trece cepas pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*: nueve *M. bovis* aislados de ganado vacuno y caprino, y cinco cepas de micobacterias aisladas de pinnípedos, cuyo análisis por REA y RFLP era conocido. La amplificación se llevó a cabo con los iniciadores OPC-20, OPB-10 e IS-1 (suficientemente discriminatorios pero de resultados estables), en las condiciones previamente optimizadas y rigurosamente respetadas (Tabla III.3).

El análisis de los perfiles generados con OPC-20 (Figura III.9) clasificó las cepas en siete tipos, existiendo mayor diferencia entre los diferentes perfiles que con los otros dos iniciadores utilizados. Las cepas 895, 14126 y 92/1161T mostraron un patrón de bandas similar, el tipo A1, el más frecuente y compartido con cepas de origen bovino; mientras que los de las cepas 894 y 14109 fueron diferentes. Las cepas Macri 12414, Friend 12538, Slade 12693, Slade 12675, y Hart 12697 compartieron el patrón de bandas A1 y la cepa Squire 14120 presentó una fuerte banda adicional (tipo A2). Las cepas Macri 11996 (tipo B1) y Graham 12786 (tipo B2) mostraron algunas bandas en común.

Los perfiles obtenidos de la amplificación con el iniciador OPB-10 (Figura III.10) tuvieron en común dos bandas (tipos A), excepto en el caso de la cepa de foca 894 (tipo B), siendo los coeficiente de similitud entre ambos de 0,25 a 0,33 (el coeficiente de similitud de Nei et ál, 1979; $F=2N_{xy}/N_x+N_y$, N_{xy} es el número de fragmentos compartidos entre dos individuos, y N_x y N_y son el número de fragmentos presentes en cada uno). De peso molecular intermedio entre las dos bandas comunes del tipo A aparecieron unos fragmentos

de escasa definición. Si estos productos se toman en consideración, las cepas pueden agruparse en seis tipos. Las cepas 895, 14126 y 92/1161T mostraron un patrón de bandas semejante, el tipo A2, presente también en las cepas de *M. bovis*; y la 14109 fue A5. Respecto a las cepas bovinas, Slade 12693, Slade 12675, y Hart 12697 fueron A4, un patrón relacionado con el tipo A1 observado en Macri 12414, el A2 de Freind 12538, y Freind 12555, y con el A3 de Graham 12786.

Al amplificar con el iniciador IS-1 todas las cepas presentaron tres bandas en común, y solamente hubo una variable (Fig. III.11). El coeficiente de similitud entre los dos tipos de perfiles (A y B) fue muy alto (0,85), y ambos tipos aparecen tanto en cepas aisladas de los pinnípedos como en las bovinas.

Tabla III.3. Resultado del análisis RAPD de cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* utilizando tres iniciadores (OPC-20, OPB-10 e IS-1).

Cepa ^a	Especie ^b (origen)	Perfil de bandas obtenido		
		OPC-20	OPB-10	IS-1
Macri 12414	<i>M. bovis</i> aislado de cabra (Western Australia)	A1	A1	A
Macri 11996	<i>M. bovis</i> (W.A.)	B1	- ^c	A
Freind 12538	<i>M. bovis</i> (W.A.)	A1	A2	B
Freind 12555	<i>M. bovis</i> (W.A.)	C	A2	B
Graham 12786	<i>M. bovis</i> (W.A.)	B2	A3	A
Slade 12693	<i>M. bovis</i> (W.A.)	A1	A4	A
Slade 12675	<i>M. bovis</i> (W.A.)	A1	A4	A
Hart 12697	<i>M. bovis</i> (W.A.)	A1	A4	A
Squire 14120	<i>M. bovis</i> (W.A.)	A2	A2	A
894	<i>M. tuberculosis</i> complex aislada de una foca (Perth, W.A.)	D	B	B
895	<i>M. tuberculosis</i> complex aislada de una foca (Perth, W.A.)	A	A2	B
14109	<i>M. tuberculosis</i> complex aislada de un león marino (Albany, W.A.)	E	A5	A
14126	<i>M. tuberculosis</i> complex aislada de un león marino (Bremer, W.A.)	A	A2	A
92/1161T	<i>M. tuberculosis</i> complex aislada de una foca (Tasmania)	A	A2	A

^a Número de referencia de la cepa en el Australian Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis (Agriculture, W.A.).

^b Identificación mediante pruebas bioquímicas y el test de la inmunoperoxidasa.

^c No se obtuvo resultado.

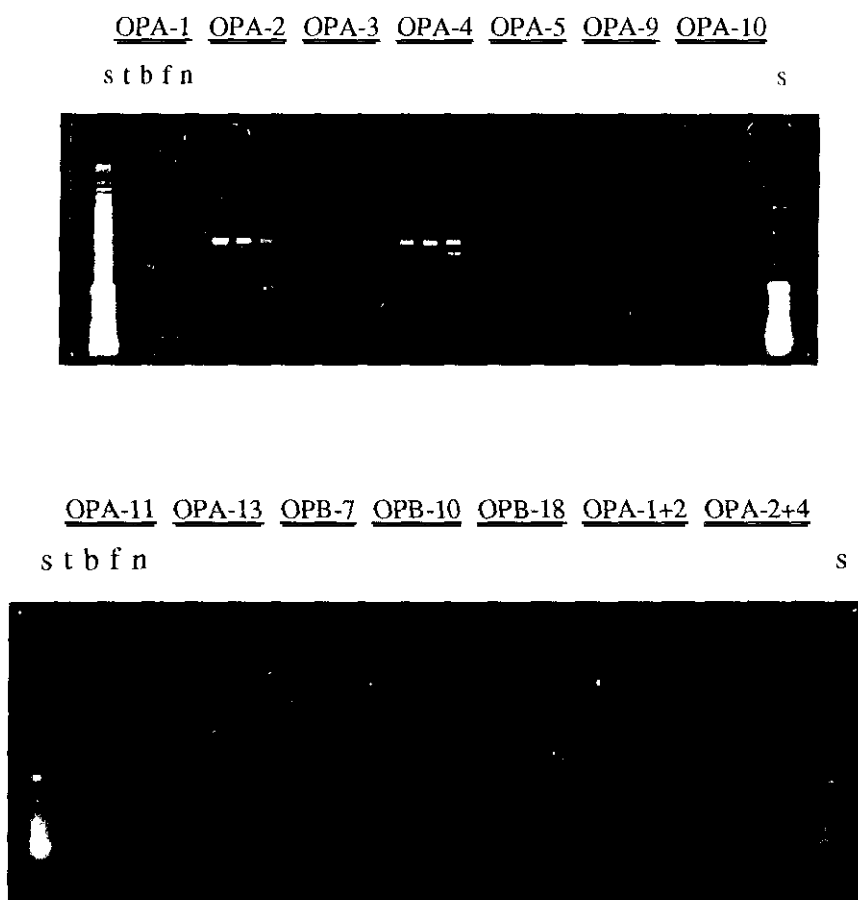


Figura III.1. Amplificación con varios iniciadores OPA y OPB (Operon), de 25 ng de ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis* cepa 942 (t), de *M. bovis* AN5 (b), del bacilo aislado de una foca cepa 894 (f) y agua ultrapura estéril (n). El estándar de pesos moleculares (s) es una mezcla de lambda DNA digerido con *Hind*III (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 p.b.), y pUC19 DNA digerido con *Hpa*II (501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 67, 34 y 26 p.b.) (Biotech).



Figura III.2. Efecto de la concentración de enzima (0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4 y 5 unidades Tth plus polimerasa/reacción) en la amplificación con el primer OPA-4 y 2 mM MgCl_2 , de 25 ng de ADN de *M. bovis* AN5.

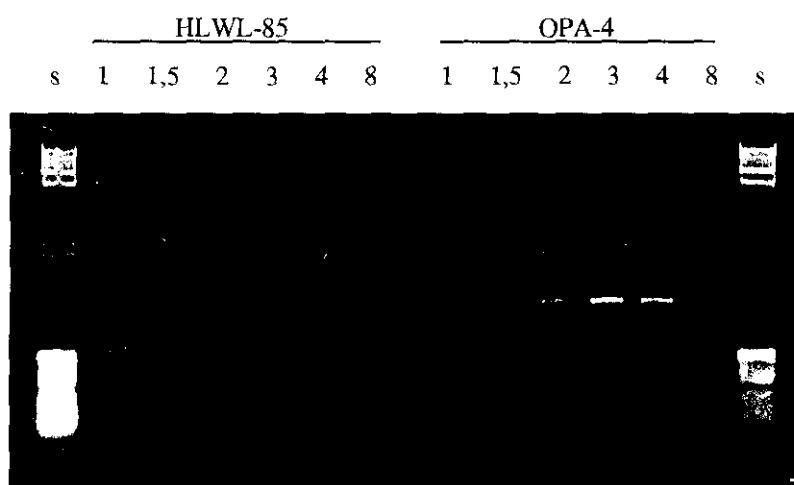


Figura III.3. Efecto de diferentes concentraciones de MgCl_2 (1, 1,5, 2, 3, 4 y 8 mM) en los patrones de bandas obtenidos al amplificar 25 ng de ADN genómico de *M. bovis* AN5 con los iniciadores HLWL-85 y OPA-4. Las calles s contienen el estándar de pesos moleculares lambda DNA/*Hind*III y pUC19 DNA/*Hpa*II (Biotech).

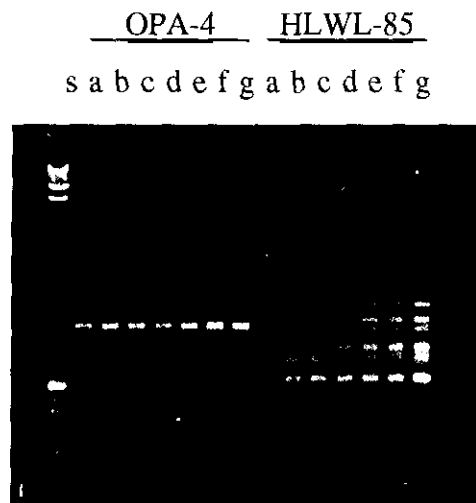


Figura III.4. Efecto de la concentración de ADN diana en el patrón de bandas. Calle a, 12,5 ng; b, 25 ng; c, 50 ng; d, 75 ng; e, 100 ng; f, 150 ng; y g, 200 ng de ADN de *M. bovis* AN5, amplificado con los primers OPA-4 y HLWL-85 y 2 u de enzima/reacción. La calle s contiene el estándar de pesos moleculares lambda DNA/*Hind*III y pUC19 DNA/*Hpa*II (Biotech).

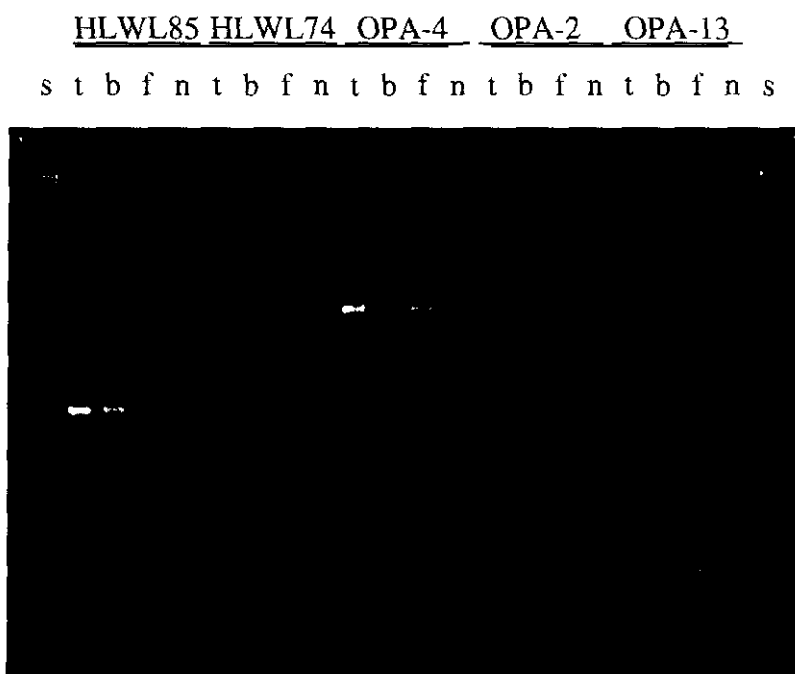


Figura III.5. Perfil RAPD producido por 200 ng de ADN de t, *M. tuberculosis* (cepa 942); b, *M. bovis* AN5; f, bacilo aislado de la foca (cepa 895); y n, agua ultrapura; al ser amplificado con los iniciadores HLWL-85, HLWL-74, OPA-4, OPA-2 y OPA-13, y en condiciones optimizadas. La calles s contienen el estándar de pesos moleculares lambda DNA/*Hind*III y pUC19 DNA/*Hpa*II (Biotech).

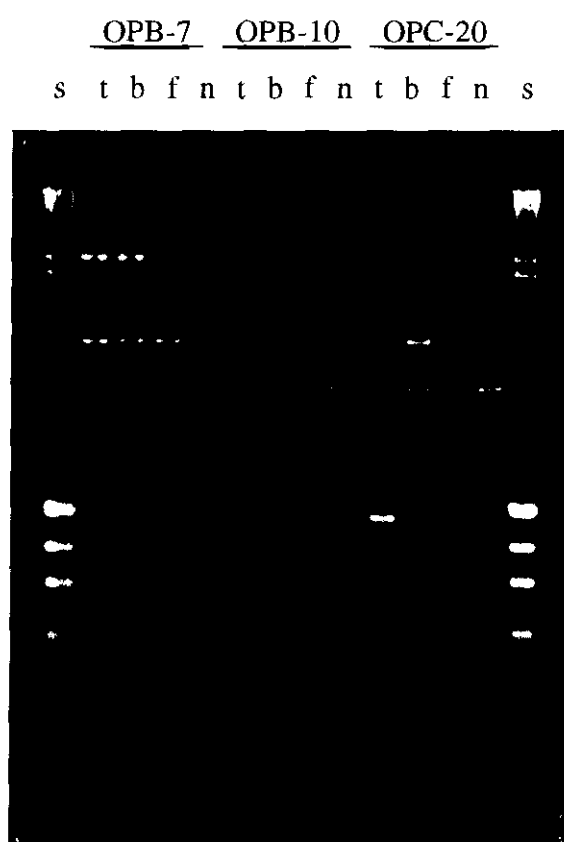


Figura III.6. Perfil RAPD producido por 200 ng de ADN de t, *M. tuberculosis* (cepa 942); b, *M. bovis* AN5; f, bacilo aislado de la foca (cepa 895); y n, agua ultrapura; al ser amplificado con los iniciadores OPB-7, OPB-10 y OPC-20, y en condiciones optimizadas. La calles s contienen el estándar de pesos moleculares lambda DNA/*Hind*III y pUC19 DNA/*Hpa*II (Biotech).

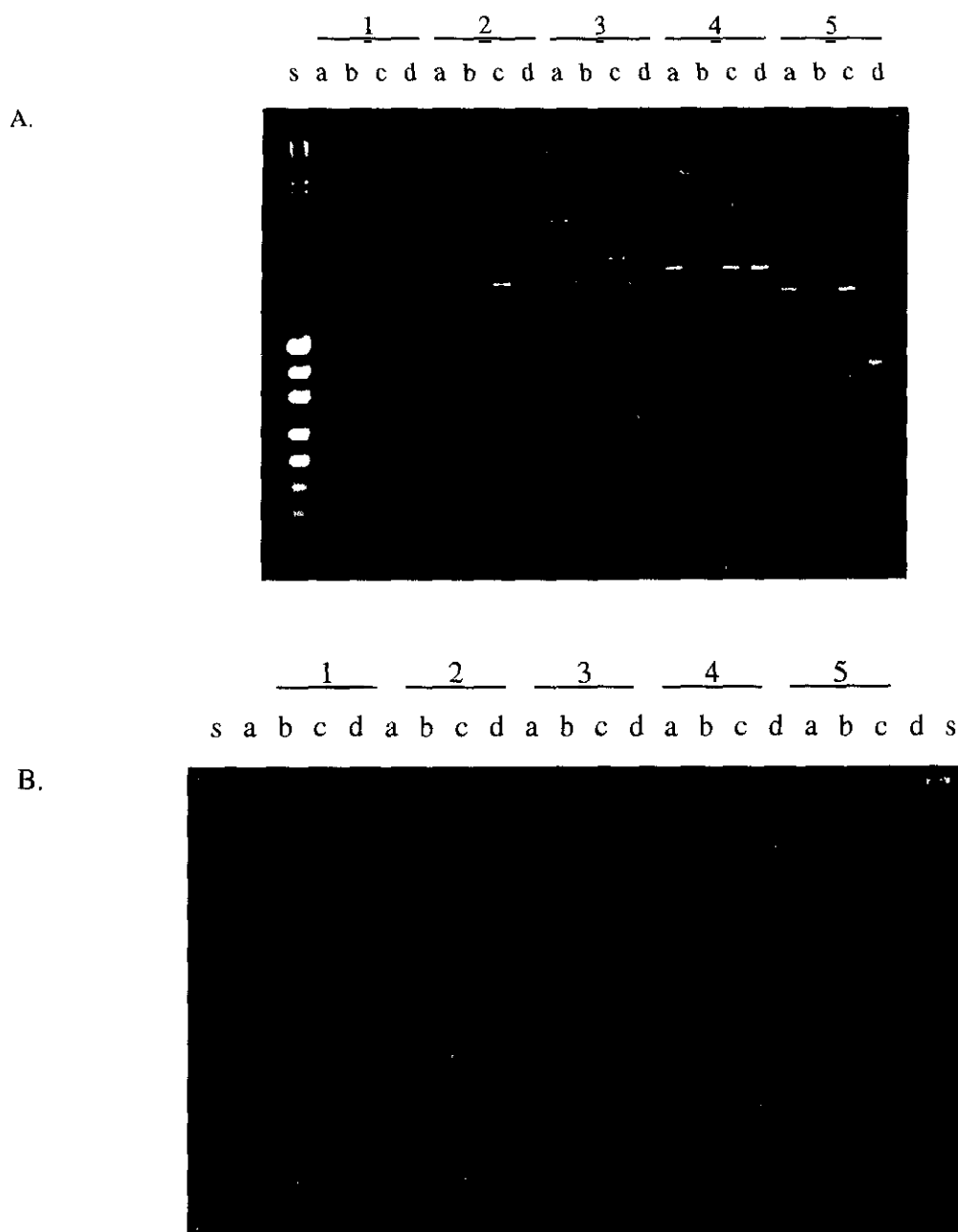


Figura III. 8. Efecto de la estabilidad de las reacciones en la reproducibilidad de los resultados con el iniciador HLWL-85 (A), y con OPC-20 (B) al amplificar 200 ng de ADN de *M. tuberculosis* complex aislado de focas: 1 y 2, cepa 894; 3, cepa 895; y 4, cepa 92/1161T, y 5, 5 µl de agua ultrapura estéril. Las reacciones se prepararon en dos lotes independientes, el lote 1 (a) y el lote 2, subdividido en tres: L2a (calles b), L2b (c) y L2c (d). Calles s, estándar de pesos moleculares lambda DNA/*Hind*III y pUC19 DNA/*Hpa*II (Biotech).

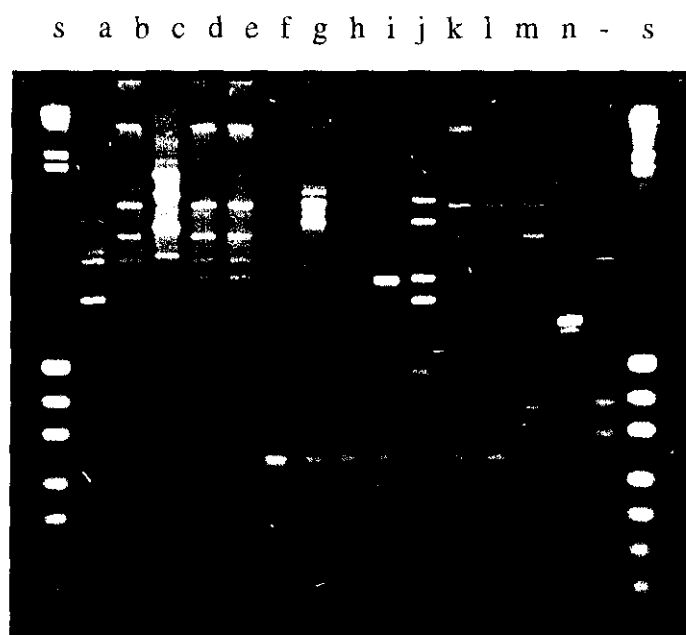


Figura III.9. RAPD con el iniciador OPC-20 de 200 ng de ADN de *M. tuberculosis* complex aislado de focas: a, 894; b, 895; c, 14109; d, 14126; e, 92/1161T; y *M. bovis*: f, Macri 12414; g, Macri 11996; h, Freind 12538; i, Freind 12555; j, Grahan 12786; k, Slade 12693; l, Slade 12675; m, Hart 12697; y n, Squire 14120. El tubo de la calle - se inoculó con 5 μ l de agua ultrapura estéril. La calles s contienen el estándar de pesos moleculares lambda DNA/*Hind*III y pUC19 DNA/*Hpa*II (Biotech).

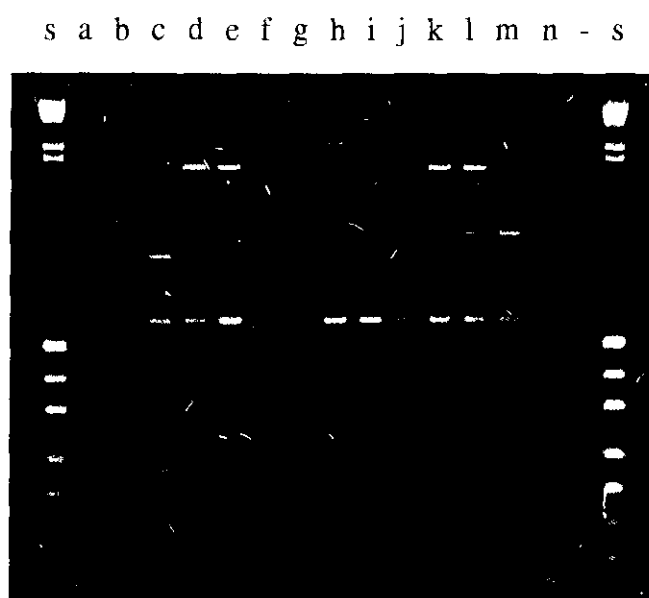


Figura III.10. RAPD con el iniciador OPB-10 de 200 ng de ADN de *M. tuberculosis* complex aislado de focas: a, 894; b, 895; c, 14109; d, 14126; e, 92/1161T; y *M. bovis*: f, Macri 12414; g, Macri 11996; h, Freind 12538; i, Freind 12555; j, Grahan 12786; k, Slade 12693; l, Slade 12675; m, Hart 12697; y n, Squire 14120. El tubo de la calle - se inoculó con 5 μ l de agua ultrapura estéril. La calles s contienen el estándar de pesos moleculares lambda DNA/*Hind*III y pUC19 DNA/*Hpa*II (Biotech).



Figura III.11. RAPD con el iniciador INS-1 de 200 ng de ADN de *M. tuberculosis* complex aislado de focas: a, 894; b, 895; c, 14109; d, 14126; e, 92/1161T; y *M. bovis*: f, Macri 12414; g, Macri 11996; h, Freind 12538; i, Freind 12555; j, Grahan 12786; k, Slade 12693; l, Slade 12675; m, Hart 12697; y n, Squire 14120. El tubo de la calle - se inoculó con 5 μ l de agua ultrapura estéril. La calle s contiene el estándar de pesos moleculares lambda DNA/*Hind*III y pUC19 DNA/*Hpa*II (Biotech).

4. DISCUSIÓN

La amplificación del ADN de diversas cepas del complejo *M. tuberculosis* con iniciadores de secuencia arbitraria indica que la técnica RAPD puede utilizarse en la caracterización de estas cepas, revelando polimorfismos que pueden ser detectados entre los productos de amplificación de diferentes aislados. Las principales ventajas sobre otros métodos de tipificación son (1) la utilización de iniciadores universales para la caracterización de una amplia variedad de especies, (2) la simplicidad del trabajo, ya que no es necesaria la realización de transferencias a membranas e hibridaciones para su detección, y (3) que puede realizarse sin conocimiento previo de la secuencia.

La elección de iniciadores idóneos es fundamental, ya que estos deben ofrecer suficiente capacidad de discriminación entre las diferentes cepas del complejo *M. tuberculosis* que han de ser tipificadas, pero manteniendo a la vez la reproducibilidad necesaria, independientemente de las mínimas variaciones diarias en la preparación de los tubos de la reacción. Con algunos iniciadores los patrones obtenidos al amplificar *M. tuberculosis*, *M. bovis* y los microorganismos del complejo *M. tuberculosis* aislados de focas son idénticos, resaltando la similitud existente en sus genomas.

La optimización de las condiciones de la reacción es indispensable para alcanzar el patrón de bandas de una cepa más completo posible. De los parámetros evaluados, los que más influyeron en los resultados fueron la concentración de enzima y las características de los ciclos de amplificación. Si la temperatura de hibridación es demasiado alta y el primer suficientemente diferente de la secuencia diana no se obtendrán productos. Los patrones de bandas cambian ligeramente conforme se eleva la temperatura, hasta que en un punto desaparecen (Welsh et ál, 1990). Algunos autores afirman que la concentración de ADN es crítica para asegurar la reproducibilidad de los resultados (MacPherson et ál, 1993; Muralidharan et ál, 1993), y que una variación en la concentración del ADN diana modifica los fragmentos generados, apareciendo unos y desapareciendo otros. Sin embargo, en nuestros resultados hemos observado que grandes variaciones en la cantidad de ADN inoculado no alteran el patrón de productos obtenido.

La permisividad de las condiciones de la reacción necesarias para la amplificación (altas concentraciones de enzima, cloruro de magnesio y ADN, y 45 ciclos con baja temperatura de hibridación) reflejan una interacción inespecífica entre los iniciadores y el ADN, responsable de la imperfecta reproducibilidad. Este hecho también ha sido atribuido a la utilización de diferentes polimerasas (Schierwater et ál, 1993) y termocicladores (MacPherson et ál, 1993; Penner et ál, 1993), debido a las pequeñas diferencias en los perfiles de rampas de las temperaturas (MacPherson et ál, 1993). Nosotros también hemos observado que la utilización de diferentes termocicladores modifica los patrones de bandas obtenidos.

La insuficiente reproducibilidad es la principal limitación de la técnica, especialmente al considerar la necesidad de la comparación de resultados entre diferentes laboratorios. Sin embargo, la reproducibilidad dentro de un mismo lote de preparación y amplificación permiten el análisis de un pequeño grupo de cepas que deban ser tipificadas simultáneamente.

En los tubos inoculados con agua ultrapura estéril se detectaron bandas. La producción de fragmentos de amplificación en tubos que no contienen ADN añadido ha sido anteriormente descrita (Williams et ál, 1990; Meunier et ál, 1993). Puede deberse a la contaminación natural de la enzima, pero esta contaminación no se considera un problema si no coinciden con las obtenidas de las muestras, y porque al añadir ADN diana éste estará presente en una concentración mucho mayor y competirá con ventaja frente al ADN contaminante durante la amplificación.

En nuestro estudio fue imposible establecer una relación epidemiológica entre los grupos de cepas originados. Sin embargo, estudios anteriores de los mismos aislados mediante RFLP mostraron que varias cepas compartían patrones idénticos y estaban relacionadas epidemiológicamente. El origen de esta divergencia entre los resultados de la tipificación por ambos métodos es desconocido. Como con otros marcadores moleculares, la información aportada por un único criterio puede ser insuficiente, por lo que es necesaria la utilización de varios marcadores para obtener la caracterización de un genoma que permita relacionar las cepas de un mismo brote de infección.

***IV. DVR-SPOLIGOTYPING DE CEPAS
DE M. bovis: UNA HERRAMIENTA EN
LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA
TUBERCULOSIS***

RESUMEN

El método *DVR-spacer oligo typing (spoligotyping)* se utilizó para la caracterización epidemiológica de ciento noventa y nueve cepas de *M. bovis* aisladas de seres humanos, animales domésticos (ganado vacuno, caprino, ovino y gatos) y salvajes (ciervos y jabalíes). Este método de tipificación detecta la presencia o ausencia de los espaciadores de la región DR. Los espaciadores, amplificados por PCR, son detectados mediante hibridación a una membrana que contiene oligonucleótidos derivados de las secuencias de los espaciadores. Se encontraron dos grupos de spoligotipos bastante homogéneos. El primero incluyó las cepas procedentes de seres humanos, ganado vacuno, animales salvajes y gatos. Las cepas procedentes de los ciervos y los jabalíes mostraron el mismo patrón que las del ganado vacuno, indicando una posible transmisión entre ambos, y destacando la importancia de estos reservorios. El segundo grupo incluyó las cepas de origen caprino y ovino. Dentro de cada uno de los grupos, los patrones de las cepas difirieron sólo ligeramente, sugiriendo que los spoligotipos son característicos de cepas con infección preferente por especies animales.

El *DVR-spoligotyping* es apropiado para el estudio de la epidemiología de *M. bovis*, especialmente de aquellas cepas que contienen una copia única de la secuencia de inserción *IS6110*. Tras el estudio de nuestros resultados podemos sugerir la tipificación inicial de las cepas de *M. bovis* mediante el *DVR-spoligotyping*, y un *RFLP* complementario de las cepas que pertenezcan a los spoligotipos más prevalentes.

Para evaluar la aptitud de este método para determinar subpoblaciones de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* se tipificaron también cepas de *M. bovis* BCG, *M. microti*, y bacilos de este complejo aislados de dassies y de focas.

1. INTRODUCCIÓN

Mycobacterium bovis es miembro del complejo *M. tuberculosis*, que incluye también *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* y *M. microti*. *M. bovis*, agente causal de la tuberculosis bovina, puede infectar a un gran número de animales domésticos y salvajes (Thoen et ál, 1984).

El control de la tuberculosis bovina en España ha llevado a una reducción en la prevalencia de esta enfermedad, aunque esta reducción está siendo menos marcada en los últimos años. En otros países donde el saneamiento del ganado ha sido difícil, la identificación de otros animales domésticos, como la cabra y la oveja (Cordes et ál, 1981; Cousins et ál, 1993) o salvajes, principalmente el ciervo (Clifton-Hadley et ál, 1991; Griffin et ál, 1994) y el tejón (Clifton-Hadley et ál, 1993) como fuentes de infección alternativas, han sido importantes para establecer nuevas medidas en el control de la infección.

Ni las diferencias fenotípicas (Barrow, 1981), ni la tipificación con fagos (Crawford et ál, 1984), han sido satisfactorias en la caracterización epidemiológica del complejo *M. tuberculosis*. El análisis del ADN con enzimas de restricción (*restriction endonuclease analysis*, REA) ha sido utilizado en el estudio de la transmisión de la infección entre el ganado vacuno y los possums (Collins et ál, 1983; Collins et ál, 1988) o los tejones (Collins et ál, 1994). Sin embargo, esta técnica no ha sido ampliamente utilizada debido a la compleja interpretación de los patrones de bandas obtenidos y la difícil comparación entre diferentes geles.

La diferenciación de cepas mediante el estudio de los polimorfismos del ADN basado en la longitud de los fragmentos producidos por restricción enzimática, utilizando sondas de ácidos nucleicos para destacar la heterogeneidad de los fragmentos específicos obtenidos (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP), ha sido muy eficaz en estudios epidemiológicos de la tuberculosis humana. La secuencia de inserción (*insertion sequence*, IS) IS6110, virtualmente idéntica a IS986 e IS987 (Hermans et ál, 1990; McAdam et ál, 1990; Thierry et ál, 1990; Hermans et ál, 1991) ha sido ampliamente utilizada como un marcador genético para el estudio de *M. tuberculosis* debido a la variabilidad en el número de copias

y a su capacidad para moverse por el genoma de diferentes cepas. Aunque se han descrito cepas de *M. tuberculosis* con una única copia o carentes de esta secuencia de inserción (Yuen et ál, 1993; Fomukong et ál, 1994; Sahadevan et ál, 1995), la mayoría de las cepas contienen entre 6 y 20 copias de este elemento (Thierry et ál, 1990; Van Soolingen et ál, 1991). El método RFLP con IS6110 ha sido aplicado con éxito en el estudio de brotes de tuberculosis en el hombre, reinfecciones endógenas, transmisión de la infección asociada al virus de la inmunodeficiencia humana, diseminación de cepas multirresistentes e infecciones nosocomiales (Hermans et ál, 1990; Mazurek et ál, 1991; Otál et ál, 1991; Beck-Sagué et ál, 1992; Daley et ál, 1992; Edlin et ál, 1992; Pearson et ál, 1992; Dwyer et ál, 1993; Genewein et ál, 1993; Tabet et ál, 1994), existiendo una propuesta de metodología estandarizada (Van Embden et ál, 1993).

La diferenciación de cepas de *M. bovis* con IS6110 depende de su origen (Van Soolingen et ál, 1994). La mayoría de los aislados del ganado vacuno presentan una única copia de este elemento (Van Soolingen et ál, 1991; Van Soolingen et ál, 1992; Collins et ál, 1993; Cousins et ál, 1993), situado en un fragmento de 1,9 Kb tras la digestión del genoma con *PvuII* (Van Soolingen et ál, 1992; Cousins et ál, 1993; Van Soolingen et ál, 1994). Las cepas de *M. bovis* aisladas de otros animales contienen varias copias de IS6110, sugiriendo que los diferentes reservorios animales podrían tener diferentes tipos de *M. bovis* (Van Soolingen et ál, 1994).

Las cepas del complejo *M. tuberculosis* contienen también cinco o seis copias de un segundo elemento de transposición, la IS1081 (Collins et ál, 1991). Entre el 90,6 y un 97,5% de las cepas de *M. bovis* muestran el mismo patrón respecto a este elemento, idéntico al de la mayoría de las cepas de *M. tuberculosis* examinadas (Van Soolingen et ál, 1992; Collins et ál, 1993). Las diferencias entre los patrones dependen solamente del tamaño de uno de los fragmentos que contienen la IS1081, indicando que la transposición de este elemento es rara y poca heterogeneidad en los puntos de inserción en el genoma (Collins et ál, 1993). Estos hechos limitan su utilización en la tipificación de cepas del complejo *M. tuberculosis*.

En el estudio de la epidemiología de la tuberculosis se han utilizado otros elementos

repetitivos: la secuencia polimórfica repetitiva con alto contenido en G+C (*polymorphic GC-rich repeat sequence*, PGRS), encontrada en el complejo *M. tuberculosis* y en otras especies de micobacterias (Ross et ál, 1992), y la secuencia de repeticiones directas (*direct repeat*, DR) (Hermans et ál, 1991; Groenen et ál, 1993). Estos elementos se han utilizado para hibridar el ADN genómico digerido con *AluI* de *M. tuberculosis* (Dwyer et ál, 1993; Van Soolingen et ál, 1993; Yuen et ál, 1993; Sahadevan et ál, 1995) y *M. bovis* (Cousins et ál, 1993; Van Soolingen et ál, 1994). Un tercer elemento de ADN repetitivo, de repeticiones en tandem (*major polymorphic tandem repeat*, MPTR), formado por repeticiones imperfectas de 10 pares de bases, separadas por 5 pares, se encuentra aproximadamente 80 veces en el cromosoma del complejo *M. tuberculosis* y otras micobacterias, y no se utiliza porque es poco polimórfico en el ADN del complejo (Hermans et ál, 1992). El principal inconveniente del RFLP es la realización del Southern blot, muy laborioso, y el requerimiento del aislamiento de varios microgramos de ADN de la bacteria (Small et ál, 1994).

El elemento DR fue identificado durante la caracterización del ADN cromosómico que flanquea la secuencia IS986 de *M. bovis* BCG (Hermans et ál, 1991). Esta región contiene un gran número de múltiples elementos DR, de 36 p.b., separados por ADN espaciador, de 35 a 41 p.b. *M. bovis* BCG contiene 49 copias de DR, agrupadas en una única posición en el cromosoma. La copia número 30 está dividida por la secuencia IS987. Los elementos DR están presentes invariable y exclusivamente en las cepas del complejo *M. tuberculosis*. El análisis en diferentes cepas de la región que contiene estas copias reveló su polimorfismo en tamaño y composición (Hermans et ál, 1991). Se denomina repetición directa variable (*direct variable repeat*, DVR) a un elemento DR más su espaciador adyacente, recibiendo una numeración conforme a un arquetipo en la cepa *M. bovis* BCG P3 (Groenen et ál, 1993). En la comparación de las regiones DR de varias cepas se observó que el orden de los espaciadores es prácticamente el mismo en todas las cepas, pero que existían delecciones e inserciones de DVRs. El polimorfismo entre las cepas se basa en la presencia o ausencia de uno o más DVRs.

El método *spacer oligo typing* (*spoligotyping*) (Kameerbeek et ál, 1995) detecta esta presencia o ausencia de los espaciadores de secuencia conocida en una cepa en dos pasos. Inicialmente, se amplifica el espaciador o espaciadores entre dos secuencias DR dianas

mediante PCR; el iniciador inverso está marcado con biotina, por lo que todas las cadenas sintetizadas a partir de él estarán también marcadas. Posteriormente, los espaciadores son detectados mediante hibridación de los productos generados por PCR a una membrana que contiene 43 oligonucleótidos unidos covalentemente, 6 (20, 21, 33-36) derivados de los espaciadores de *M. bovis* BCG y 37 de *M. tuberculosis* H37Rv (Kamerbeek et ál, 1996).

El objetivo de este trabajo fue la evaluación de este método en la diferenciación de cepas de *M. bovis* aisladas de seres humanos, animales domésticos (ganado vacuno, caprino y ovino, y gatos) y salvajes (ciervos y jabalíes) para determinar su utilidad como herramienta en la epidemiología de la tuberculosis.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. CEPAS UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO

Se estudiaron ciento ochenta y dos cepas de *M. bovis*, aisladas a partir de muestras recibidas en el Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de Madrid (U.C.M.). Las muestras provenían de ganado vacuno (n=129), caprino (n=44), ovino (n=1), gatos domésticos (n=2), jabalíes (*Sus scrofa*) (n=4) y ciervos (*Cervus elaphus*) (n=2) de diferentes Comunidades Autónomas españolas. Las cepas se identificaron como *M. bovis* en función de su crecimiento lento, la morfología de las colonias, la tinción de ácido-alcohol resistencia, pruebas bioquímicas convencionales (Vestal, 1975), y amplificación por PCR de la IS6110 (Hermans et ál, 1990), del ARNr 16S y la MPB70 (Wilton et ál, 1990) y de la IS1081 y *mp40* (Liébana et ál, 1996). Asimismo se estudiaron 17 cepas de *M. bovis* aisladas de seres humanos, cedidas por el Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal (Madrid).

2.1.1. Cepas de origen animal

Las 129 cepas bovinas fueron aisladas de animales de 34 granjas (b·1 a b·34), localizadas en diferentes áreas de España; las granjas b·1 a b·13 en León, la granja b·14 en Cantabria, b·15 y b·16 en Madrid y Guadalajara respectivamente, y b·17 a b·34 en varios pueblos de Cataluña (Tabla IV.1). Las 44 cepas caprinas se aislaron de 8 granjas (c·1 a c·8) (Tabla IV.2). Las granjas c·1 a c·6 están situadas en Cataluña, estando las granjas c·1 y c·2 muy próximas entre sí. Los rebaños c·7 y c·8 están en Madrid. La oveja perteneció a una granja situada en el mismo área que la granja c·6.

Los gatos pertenecieron a particulares de la ciudad de Madrid. El primer gato fué una hembra con tuberculosis generalizada; el segundo, un macho con lesiones que afectaban al pulmón y nódulos linfáticos asociados (Tabla IV.3.). Los 4 jabalíes fueron cazados en una reserva natural en Extremadura. Tres de ellos presentaron lesiones granulomatosas en varios nódulos linfáticos, pulmón e hígado. El cuarto animal mostró lesiones en la articulación del codo. Los ciervos, con tuberculosis pulmonar, fueron capturados en Cataluña (Tabla IV.3).

Tabla IV.1. Cepas de *M. bovis* de origen bovino procedentes de diferentes Comunidades Autónomas españolas utilizadas en este estudio.

Granja, no. de referencia		Municipio o Comarca	Referencia de las cepas	Información de las explotaciones
Estudio	Figuras			
b-1	León 1	La Cuesta La Bañeza, León	LO131	Pequeña explotación de montaña aislada de hembras de cría y terneros para engorde. Condiciones higiénicas insuficientes. Tuberculosis enzootica al menos desde 1992.
b-2	León 21	Valdemora Valencia de Don Juan, León	LO135, LO110, LO72, LO156, LO125, LO129, LO98, LO86, LO74, LO111, LO108, LO101	Gran explotación de frisonas para producción de leche y venta de terneros. Condiciones higiénicas deficientes. Brote explosivo de tuberculosis (2/60 animales en 1993, la mayoría en 1994), con vaciado sanitario.
b-3	León 51	San Félix de la Valdería La Bañeza, León	LO48	Explotación media de frisonas para producción de leche y venta de terneros. Condiciones higiénicas insuficientes. Brote de tuberculosis (4/20) ya eliminado.
b-4	León 56	Val de San Román Astorga, León	LO59, LO60, LO6	Explotación media de frisonas para producción de leche y venta de terneros. Condiciones higiénicas medio-insuficientes, con otros animales domésticos. Tuberculosis enzoótica, vaciado sanitario en 1990, y reaparición de la infección (3/21 en 1993 y 3/25 en 1994).
b-5	León 7	Calzada de la Valdería La Bañeza, León	LO89, LO75	Pequeña explotación de frisonas para producción de leche y venta de terneros. Condiciones higiénicas insuficientes. Tuberculosis enzootica al menos desde 1992.
b-6	León 14	Santa María de la Isla La Bañeza, León	LO83	Gran explotación de frisonas para producción de leche y animales selectos para venta a otras explotaciones. Buenas condiciones higiénicas. Brote de tuberculosis (eliminado) por introducción de ganado no saneado (29/58 en 1993, 1/60 en 1994).

(Continuación)

Granja, no. de referencia		Municipio o Comarca	Referencia de las cepas	Información de las explotaciones
Estudio	Figuras			
b-7	León 19	Cebrones del Río La Bañeza, León	LO133, LO134	Explotación media de frisonas para producción de leche y terneros. Condiciones higiénicas insuficientes. Brote de tuberculosis (5/21 en 1992, 6/35 en 1883, 10/40 en 1994, 2/35 en 1996) por introducción de ganado no saneado.
b-8	León 27	San Cristóbal de la Polantera La Bañeza, León	LO103	Pequeña explotación de frisonas para producción de leche y terneros. Condiciones higiénicas insuficientes. Tuberculosis enzoótica (7/15 en 1992, 1/13 en 1993, 1/4 en 1994).
b-9	León 38	Quintana de Rueda León	LO35, LO94, LO56, LO104	Explotación media de frisonas para producción de leche y terneros. Condiciones higiénicas insuficientes. Tuberculosis enzoótica desde 1992, brote (10/15 en 1994) y vaciado sanitario.
b-10	León 41 o Ponferrada	Mansilla Mayor León	LO50, LO51, P24	Explotación variable con hembras en producción y cría de terneras frisonas para producción. Compra animales sin garantías sanitarias. Condiciones higiénicas insuficientes. Tuberculosis enzoótica. La cepa P24 se obtuvo de un animal sacrificado en el matadero de Fribierzo (Ponferrada) dos años antes; al obtenerse el mismo patrón se investigó su origen, encontrándose que procedía de esta granja.
b-11	León 29	Val de San Lorenzo Astorga, León	LO142, LO13, LO37	Explotación variable con hembras de producción lechera para engorde de terneros. Compra terneros sin garantías sanitarias. Condiciones higiénicas medio-insuficientes. Tuberculosis enzoótica desde hace mucho tiempo (11/78 en 1992, 28/67 en 1993, 8/50 en 1994).

(Continuación)

Granja, no. de referencia		Municipio o Comarca	Referencia de las cepas	Información de las explotaciones
Estudio	Figuras			
b-12	León 37	Quintana de Rueda León	LO96, LO1	Explotación media de frisonas para producción de leche y terneros. Condiciones higiénicas insuficientes. Tuberculosis enzoótica, pocas bajas anuales desde hace varios años.
b-13	León 54	San Román de la Vega Astorga, León	LO22, LO18, LO23, LO8, LO9	Explotación media de frisonas para producción de leche y venta de terneros. Buenas condiciones higiénicas. Brote y posterior enzoootía (6/43 en 1992, 2/31 en 1993, 15/30 y 6/11 en 1994, 2/3 en 1995) por introducción de ganado sin garantías sanitarias, vaciado total.
b-14	Torrelavega	Torrelavega Santander	S4	Gran explotación de frisonas para producción de leche. Buenas condiciones higiénicas. Pequeño brote (4/300) de tuberculosis.
b-15	Madrid	Madrid	M1g	- ^a
b-16	Guadalajara	Campillo de Ranas Ayllón, Guadalajara	VGud	Explotación extensiva para producción cárnica. Importa animales de León, aparentemente libres. Brote de tuberculosis (38/70).
b-17	Barna 806.AS	Tavèrnoles Osona, Barcelona	B8, B9, B11b, B2	-
b-18	Barna 653.BD	St. Agustí de Lluçanès Osona, Barcelona	B103, B29, B77, B95, B102	Explotación media de frisonas para producción de leche. Condiciones higiénicas intermedias. Brote de tuberculosis (21/21 en 1991) y vaciado sanitario.
b-19	Barna 661.BC	St. Boi de Lluçanès Osona, Barcelona	B75, B79, B80, B83	Explotación media de frisonas para producción de leche. Condiciones higiénicas intermedias. Brote de tuberculosis (17/27 en 1991) ya eliminado.

(Continuación)

Granja, no. de referencia		Municipio o Comarca	Referencia de las cepas	Información de las explotaciones
Estudio	Figuras			
b-20	Barna 583.AG	Prats de Lluçanès Osona, Barcelona	B23	Explotación media de frisonas para producción de leche. Condiciones higiénicas intermedias. Brote de tuberculosis (17/17 en 1991) y vaciado sanitario.
b-21	Barna 536.CE	Perafità Osona, Barcelona	B89, B98, B108, B113	-
b-22	Barna 661.AS	St. Boi de Lluçanès Osona, Barcelona	B114	-
b-23	Barna 405.AB	Mallà Osona, Barcelona	B43, B51, B26, B56	Gran explotación de frisonas para producción de leche. Condiciones higiénicas intermedias. Infección enzoótica, manteniendo los animales positivos en la explotación, y posterior brote (33/96).
b-24	Barna 397.AV	Lluçà Osona, Barcelona	B91, B73, B70	Gran explotación de frisonas para producción de leche. Condiciones higiénicas intermedias. Brote de tuberculosis (24/53 en 1991, 21/32 y 7/11 en 1992) y vaciado sanitario.
b-25	Barna 536.CE	Perafità Osona, Barcelona	B157	-
b-26	Salvi	Mollet del Vallès Vallès Oriental, Barcelona	B134, B133, B155	-
b-27	Laugil	Tremp, Pallars Jussà, Lleida	B130, B144	-
b-28	Vilas	Tremp, Pallars Jussà, Lleida	B147, B149	-

(Continuación)

Granja, no. de referencia		Municipio o Comarca	Referencia de las cepas	Información de las explotaciones
Estudio	Figuras			
b-29	Verge	Penelles Segarra, Lleida	B402, B299, B224, B282, B288, B301, B305, B388, B392, B394, B395, B396, B412, B213, B219, B284, B289, B378 B390, B380	Explotación media de frisonas para producción de leche. Condiciones higiénicas intermedias. Brote de tuberculosis y vaciado sanitario. Aparece un nuevo brote en los animales de la reposición.
b-30	133.AD	Borredà Berguedà, Barcelona	B171	-
b-31	215.CG	Folgueroles Osona, Barcelona	B186, B193, B195	Explotación media de frisonas para producción de leche. Condiciones higiénicas intermedias. Brote reducido (eliminado).
b-32	Agusti	Llivia, Gerona	B204, B206, B297, B246, B265, B277, B335, B336, B338, B357, B359, B370, B382, B386, B405, B416, B428, B425, B435, B242, B203	-
b-33	Teruel o Teruel 2	?	B270, B302, B304, B293, B268, B315	Animales procedentes de la provincia de Teruel. Explotación y características desconocidas.
b-34	Bravas	?	B443	-

^a -, información no disponible

Tabla IV.2. Cepas de *M. bovis* de origen caprino y ovino procedentes de diferentes Comunidades Autónomas españolas utilizadas en este estudio.

Granja, no. de referencia		Municipio o Comarca	Referencia de las cepas	Información de las explotaciones
Estudio	Figuras			
c-1	Barna 1	St. Pere de Villamayor Vallés Oriental, Barcelona	CB35, CB22, CB23, CB70, CB76, CB61, CB26, CB20, CB11, CB27, CB3	Explotación de animales procedentes de Murcia-Granada-Málaga. Buenas condiciones higiénicas. Reposición con animales propios, excepto los machos. Intercambia animales con c-2 y c-3.
c-2	Barna 2	Canoves Vallés Oriental, Barcelona	CB56, CB38, CB57, CB6, CB28(36), CB29, CB7, CB21(30), CB9(13-34), CB8(18), CB52(53), CB32, CB40b, CB58b, CB54	Explotación de animales procedentes de Murcia-Granada-Málaga. Buenas condiciones higiénicas. Reposición con animales propios, excepto los machos. Intercambia animales con c-1 y c-3. Los últimos machos comprados proceden de Artesa de Segre (Lleida).
c-3	Barna 3	Les Franqueses del Vallés Vallés Oriental, Barcelona	1923, 463	Explotación de animales procedentes de Murcia-Granada-Málaga. Buenas condiciones higiénicas. Reposición con animales propios, excepto los machos. Intercambia animales con c-1 y c-2.
c-4	Barna 4	Cabrils Maresme, Barcelona	4/21, 4/6, 4/1	- ^a
c-5	Barna ?	Artesa de Segre Lleida	CB82, CB83	-
c-6	Barna 6	l'Albiol Baix Camp, Barcelona	57c, 25c, 45c, 39c, 46c	-
c-7	Madrid	Fuencarral Madrid	CAM2	Cabra de raza del Guadarrama. Mantenido en una granja-escuela, había sido adquirida un año antes en c-8. El resto de los animales estudiados fueron negativos.
c-8	Colmenar o Madrid	Buitrago Madrid	v1CAM, c300/95, col1, col2, col3	Centro de selección de la raza del Guadarrama. Buenas condiciones higiénicas. La mayor parte de los animales están infectados. Animales adquiridos en diferentes localidades.
o-1	Barcelona	l'Albiol Baix Camp, Barcelona	ovino	Cepa obtenida de vísceras de matadero.

^a -, información no disponible

Tabla IV.3. Cepas de *M. bovis* de varios orígenes utilizadas en este estudio.

Animal estudiado	Localidad o Comarca	Referencia de las cepas	Información adicional
Jabalí 1	Finca Valdelacasa Sierra de San Pedro, Cáceres	J1	Capturado en montería. Granulomas en ganglios linfáticos.
Jabalí 2	Finca Valdelacasa Sierra de San Pedro, Cáceres	J2	Capturado en montería. Lesiones en hígado, pulmón y ganglios linfáticos.
Jabalí 3	Diferente finca Sierra de San Pedro, Cáceres	J3	Capturado en montería. Lesiones en pulmón y ganglios linfáticos.
Jabalí 4	Torrejón el Rubio, Cáceres	J4	Animal capturado vivo con una grave cojera. Granulomas articulares.
Ciervo 1	Vergadá, Barcelona	Ciervo1	Procede de un rebaño de animales capturados en Extremadura y mantenidos en parques para cría y repoblación. Animal de 6 meses, con lesiones en ganglios mesentéricos, ileocecales y submandibulares.
Ciervo 2	Vergadá, Barcelona	Ciervo2	Procede de un rebaño de animales capturados en Extremadura y mantenidos en parques para cría y repoblación. Hembra adulta, con lesiones en cavidad torácica, abdominal y glándula mamaria.
Gato 1	Madrid	Pancho	Gato doméstico, mantenido en un domicilio particular. Alimentación casera. Presentaba lesiones en los ganglios linfáticos mesentéricos, hígado y cavidad torácica.
Gato 2	Madrid	Rita	Gata doméstica, mantenida en domicilio particular. Alimentación comercial. Presentaba lesiones en pulmón, pericardio y ganglios linfáticos.

2.1.2. Cepas de origen humano

Los *M. bovis* de origen humano habían sido aisladas de pacientes HIV positivos afectados por un brote nosocomial, caracterizado por una resistencia total a los tuberculostáticos, ocurrido entre 1993 (fecha del ingreso del primer enfermo) y 1995. Los aislados eran resistentes a la isoniazida (hidracida del ácido isonicotínico o INH), rifampicina, etambutol, estreptomycin, etionamida, cicloserina, claritromicina, capreomicina, ofloxacina, ácido paraaminosalicílico (PAS) y ampicacina.

2.2. PREPARACIÓN DEL ADN

Las cepas se cultivaron en 15 ml de Middlebrook 7H9, suplementado en un 10% (v/v) con OADC *enrichment* w/WR 1339 (Difco, Detroit, MI), 1 g/l de hidrolizado pancreático de caseína (Difco) y 4 g/l de piruvato sódico (Merck, Darmstadt, Alemania), e incubaron a 37°C hasta obtener crecimiento suficiente. El medio Middlebrook 7H9 (Difco) contiene 0,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g de KH_2PO_4 , 2,5 g de Na_2HPO_4 , 0,1 g de citrato sódico, 0,05 g de MgSO_4 , 0,5 µg de CaCl_2 , 1 µg de ZnSO_4 , 1 µg de Cu_2SO_4 , 0,5 g de ácido L-glutámico, 0,04 g de citrato amónico férrico, 1 µg de piridoxina, 0,5 µg de biotina, pH $6,6 \pm 0,2$, para un litro de agua. Bacto Middlebrook OADC Enrichment w/WR 1339 (Difco) contiene en 100 ml de agua destilada, 0,05 g de ácido oléico, 5 g de la fracción V de albúmina bovina, 2 g de dextrosa, 4 µg de catalasa de vacuno, 0,85 g de NaCl y 0,25 g de Tritón[®] WR 1339.

Las células se recogieron por centrifugación a 3.700 g durante 30 minutos en una centrífuga Sigma 3-10, descartando el sobrenadante. El sedimento obtenido se inactivó a 75°C durante 30 minutos y se transfirió a un tubo eppendorf. Los restos que quedaban en el tubo de centrífuga se recuperaron lavando con 1,5 ml de PBS estéril, centrifugando en un nuevo eppendorf a 12.500 r.p.m. 10 minutos en una centrífuga Eppendorf 5415-C y añadiendo el sedimento formado al primer eppendorf, ajustando el volumen final a 350 µl con TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8). Las células se lisaron con 50 µl de lisozima (20 mg/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), incubando a 37°C durante 3 horas, y posteriormente con 50 µl de dodecil sulfato sódico (SDS) al 10% y 50 µl de proteinasa K (1 mg/ml) (Sigma

Chemical Co.) a 50°C entre 12 y 16 horas. La extracción del ADN se realizó mediante incubación a 65°C durante 10 minutos con 100 µl de NaCl 5 M y 80 µl de CTAB/NaCl precalentado. La fase acuosa que contiene el ADN se separó tras la adición de 600 µl de cloroformo:isoamílico (24:1) y centrifugación a 6.500 r.p.m. 5 minutos. Esta fase acuosa se purificó con 600 µl de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) (Sigma Chemical Co.) y nueva centrifugación a 6.500 r.p.m. durante 5 minutos. El ADN se precipitó con 400 µl de isopropanol (Sigma Chemical Co.) a -20°C al menos durante 30 minutos y centrifugación a 6.500 r.p.m. 5 minutos, y se lavó dos veces con 1 ml de etanol frío al 70%. Se secó en la estufa a 37°C y resuspendió en 30 µl de TE.

La concentración y calidad del ADN extraído se calculó mediante electroforesis de 1 µl en geles de agarosa Molecular Biology Certified Agarose, Ultra Pure DNA Grade (BioRad Laboratories, Richmond, CA) al 0,8% a 80V durante 0,6 horas. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 30-45 minutos y se fotografiaron en un transiluminador Reprostar II (Camag, Muttentz, Switzerland) de luz ultravioleta con una MP24 Land Camera (Polaroid) utilizando película 667 (Polaroid). La estimación se realizó según la fuerza de las bandas de ADN; aproximadamente una banda muy fuerte equivale a 1 µg/µl, mientras que una banda muy débil equivale a 0,2 µg/µl. Para inocular en cada tubo una cantidad similar de ADN, que posteriormente no distorsionara la interpretación de los resultados, éste se diluyó a 20 µg/µl, a excepción del que no pudo observarse en los geles.

2.3. ADAPTACIÓN DEL MÉTODO EN NUESTRO LABORATORIO

2.3.1. Evaluación del primer marcado con biotina

Para la obtención de resultados es necesario contar con un perfecto marcado del iniciador HDR-RB. En las pruebas iniciales realizadas con iniciadores preparados por Biotech International (Perth, Western Australia), los resultados obtenidos fueron débiles e insuficientes. Uno de los motivos puede ser una escasa amplificación de los espaciadores o una insuficiente calidad del primer marcado con biotina. Para descartar un error en estos componentes, se prepararon dos lotes de tubos utilizando los mismos reactivos: 10 µl de

buffer 5x (Tris-HCl 335 mM, pH 8.8 a 25°C, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 83 mM, dNTPs 1 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, EDTA 30 μM , gelatina 1 mg/ml) (Biotech International), MgCl_2 2 mM, 1,1 unidades de Tth plus polymerase (Biotech International) y 120 ng de cada oligonucleótido iniciador, HDR-F y HDR-RB, sintetizados y marcados por Oswell DNA Services (Southampton, UK) y por Biotech International. Cada grupo de tubos se inoculó en paralelo con 5 μl de una dilución 1/10 de una suspensión equivalente a la densidad del número 5 de la escala de MacFarland e inactivada a 99°C durante 10 minutos de las cepas *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* (cepa canadiense) y una micobacteria del complejo *M. tuberculosis* aislada de una foca, así como con 5 μl de agua MQ estéril como control negativo.

La amplificación se llevó a cabo en un Corbett FTS-1 thermalcycler (Corbett Research, Mortlake, New South Wales) utilizando 35 ciclos de desnaturalización a 95°C, hibridación a 55°C y extensión a 72°C durante 30 segundos; la primera desnaturalización y la última extensión se prolongaron 10 minutos. La presencia de los productos de la amplificación se detectó por electroforesis a 100V durante 30 minutos en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Para verificar el estado de la biotina, se depositó en una membrana Hybond-N+ (Amersham International, Buckinghamshire) 1 μl de cada producto de PCR obtenido y de sus diluciones decimales preparadas en agua ultrapura estéril. Los productos se fijaron a la membrana humedeciendo ésta sobre papel Whatman 3MM empapado en NaOH 0,4 N, aclarando después dos veces, 10 minutos cada una, en 2x SSPE (NaCl 360 mM, NaH_2PO_4 20 mM, EDTA 2 mM pH 7.2) con 0,5% de dodecil sulfato sódico (SDS) a 60°C. Los productos se detectaron incubando la membrana con 5 μl de *streptavidin-peroxidase conjugate* (Boehringer Mannheim) en 10 ml de 2x SSPE/0,5% SDS durante 45 minutos a 42°C. El exceso de conjugado se eliminó lavando la membrana dos veces en 2x SSPE/0,5% SDS a 42°C durante 10 minutos y aclarando brevemente en 2x SSPE a temperatura ambiente. La detección se realizó con el sistema ECL (Amersham International), exponiendo una película ECL-Hyperfilm (Amersham International) a la membrana durante 5 minutos.

2.3.2. Concentración del conjugado estreptavidina-peroxidasa y exposición

Con el objeto de comprobar si los débiles resultados iniciales se debían a una insuficiente concentración de *streptavidin-peroxidase conjugate* (Boehringer Mannheim) durante la detección, se realizaron en paralelo dos detecciones de un mismo lote de tubos, con varias concentraciones de conjugado: 2,5 µl (recomendado en el protocolo original), 5 µl y 7,5 µl en 10 ml de 2x SSPE/0,5 %SDS, y exponiendo varias películas Hyperfilm-ECL en tiempos seriados a cada una de ellas.

2.4. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS ESPACIADORES DE LA REGIÓN DR

La amplificación y la detección se realizaron siguiendo el método propuesto por Kamerbeek y colaboradores (1995) con algunas modificaciones. La amplificación se realizó en 50 µl conteniendo 10 µl de buffer 5x (Tris-HCl 335 mM, pH 8.8 a 25°C, (NH₄)₂SO₄ 83 mM, dNTPs 1 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, EDTA 30 µM, gelatina 1 mg/ml) (Biotech International), MgCl₂ 2 mM, 120 ng de cada oligonucleótido iniciador HDR-F y HDR-RB (Oswell DNA Services, Southampton) y 1.1 unidades de Tth plus polymerase (Biotech International).

Los iniciadores HDR-F y HDR-RB (marcado con biotina en el extremo 5'), descritos por Hermans et ál (1991), hibridan en las secuencias DR amplificando los espaciadores situados entre ellas. Las soluciones de los iniciadores y los tubos de PCR ya preparados se conservaron a 4°C hasta su utilización para evitar dañar la biotina en la congelación. Los tubos se inocularon con 5 µl de ADN diana, aproximadamente equivalentes a 100 ng de ADN.

Tabla IV.4. Iniciadores y concetración utilizada en la reacción de amplificación de los espaciadores de la región DR.

Iniciador	Secuencia 5' → 3'	Peso molecular	Concentración
HDR-F	CCG AGA GGG GAC GGA AAC	5587	120 ng (21 pmoles)
HDR-RB	GGT TTT GGG TCT GAC GAC	5945	120 ng (20 pmoles)

La amplificación se llevó a cabo en un Corbett FTS-1 thermalcycler (Corbett Research) utilizando 35 ciclos de desnaturalización a 95°C, hibridación a 55°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 30 segundos, la primera desnaturalización y la última extensión se prolongaron 10 minutos.

La amplificación del ADN se comprobó mediante electroforesis a 100 V durante 0,6 horas en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 30 minutos. Los productos amplificados no aparecen como bandas, sino como lenguas de ADN debido a la insuficiente resolución de los múltiples pequeños fragmentos de diferentes tamaños generados.

Como controles en cada lote de tipificación se incluyeron las cepas *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG P3, cedidas por la Unit Molecular Biology, National Institute of Public Health and Environmental Protection (Bilthoven, The Netherlands) y agua ultrapura estéril.

2.5. HIBRIDACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR Y DETECCIÓN

La membrana que contiene los oligonucleótidos derivados de los espaciadores fue cedida por el Dr. J.D.A. van Embden y sus colaboradores (Unit Molecular Biology, National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands). La membrana se lavó en 2x SSPE (NaCl 360 mM, NaH₂PO₄ 20 mM, EDTA 2 mM pH 7.2) suplementado con 0,1% de dodecil sulfato sódico (SDS) durante 5 min a 60°C. La membrana se colocó en un miniblottter MN45 (Immunetics, Cambridge, MA) de forma que el patrón de líneas de los oligonucleótidos quedara perpendicular y en contacto con los canales del miniblottter.

La hibridación se realizó por unión del ADN amplificado a múltiples oligonucleótidos sintéticos derivados de los espaciadores, unidos covalentemente a la membrana (Kaufhold et al, 1994). Para ello, 20 µl de cada producto de PCR, disueltos en 150 µl de 2x SSPE/0,1% SDS se desnaturalizaron a 99°C durante 10 minutos utilizando el termociclador, y se enfriaron

inmediatamente en hielo. En cada prueba se caracterizaron simultáneamente 42 cepas, además de incluir los controles. Cada canal se llenó con 150 µl de cada producto desnaturalizado, sellando con cinta los extremos para evitar que se secase, y la hibridación se incubó durante 1 hora a 60°C. Posteriormente, tras vaciar los canales por aspiración, se retiró la membrana y se lavó dos veces con 250 ml de 2x SSPE/0,5% SDS durante 10 minutos a 60°C para eliminar el producto que no hubiera hibridado.

Para la detección la membrana se incubó en 10 ml de 2x SSPE/0,5% SDS con 5 µl de *streptavidin-peroxidase conjugate* (Boehringer Mannheim) durante 45 minutos a 42°C en un horno de hibridación Hybaid. La membrana se lavó dos veces en 150 ml de 2x SSPE/0,5% SDS durante 10 minutos a 42°C y se enjuagó en 2x SSPE 5 minutos a temperatura ambiente. El ADN hibridado se detectó con el sistema ECL (Amersham International), una combinación de peróxido de hidrógeno (sustrato de la peroxidasa) y luminol, cuya oxidación produce luz azul. En la oscuridad, la membrana se incubó con 10 ml de ambos reactivos durante 1 minuto, se colocó entre dos hojas de transparencia y se expuso una película ECL-Hyperfilm (Amersham International) durante 12 minutos.

Después de cada detección, la membrana se deshibridó con cuatro lavados en SDS al 1% durante 20 minutos a 80°C, seguido de una incubación en EDTA 20 mM, pH 8 durante 15 minutos a temperatura ambiente. La membrana se conservó húmeda en una bolsa plástica sellada en refrigeración hasta su reutilización.

El análisis de las autoradiografías con los patrones de hibridación se realizó con la versión para Windows del programa de ordenador GelCompar, versión 3.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Con el propósito de evaluar la utilidad de este método de tipificación respecto a otros existentes, los resultados obtenidos en la tipificación de las cepas con DVR-spoligotyping se compararon con los obtenidos en la caracterización mediante RFLP con *IS6110* de 120 de las cepas. Dicha caracterización y la metodología utilizada, digestión del ADN genómico con la enzima de restricción *PvuII*, hibridación con dos sondas marcadas con digoxigenina (RHS y

LHS) y detección con el *alkaline phosphatase-conjugate antibody DNA detection kit* (Boehringer Mannheim) han sido descritos previamente (Liébana, 1996).

2.6. DVR-SPOLIGOTYPING DE CEPAS DE OTRAS ESPECIES DEL COMPLEJO *M. tuberculosis*

Con el objetivo de conocer la capacidad de discriminación de este método de tipificación, y su capacidad para diferenciar subpoblaciones de cepas de una misma especie, incluimos en este estudio la caracterización de ADN de varios microorganismos del complejo *M. tuberculosis* pertenecientes a la colección de cultivos del Australian Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis (Agriculture, Western Australia) (Tabla IV.5).

Las micobacterias de los pinnípedos (*seal bacillus*) habían sido aislados de tuberculosis pulmonar del león marino australiano (*Neophoca cinerea*), de la foca peletera de Nueva Zelanda (*Arctocephalus forsteri*) y de la foca peletera australiana (*Arctocephalus pusillus doriferus*); animales salvajes encontrados en Bremmer (cepa 14126), Albany (14109) y Yallingup (20296) (diferentes áreas de Western Australia), y Tasmania (92/1162/T) y de 6 animales de una colonia mantenida en cautividad (Atlantis Marine Park), formada principalmente de animales salvajes capturados (6481, 6482, 6510, 6954, 6884, 6866), así como la cepa obtenida de su entrenador (146/D).

Los *dassie bacillus* habían sido aislados de lesiones tuberculosas en pulmón e hígado de dos hyrax o dassies (*Procavia capensis*), importados de Sudáfrica y mantenidos en el zoo de Perth (Western Australia) (cepas 13499 y 14114). En la caracterización se incluyeron otras dos cepas aisladas de animales de esta especie (TB23/91Sw y 7171), y tres cepas de *Mycobacterium microti*, una de referencia (NCTC 08710) y dos aislados obtenidos de ratones (3377 y 3381).

Tabla IV. 5. Cepas del complejo *M. tuberculosis* (Australian Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis, Agriculture, Western Australia) incluidas en este estudio.

Especie del complejo <i>M. tuberculosis</i>	Número	Origen
<i>M. bovis</i>	54	Cepas de origen humano de Irán (3), Irlanda (2), Reino Unido (3) y Australia (46).
<i>M. bovis</i> BCG	19	Cepa de referencia TMC 1029 (EEUU); cepa de referencia P3 (RIVM, Holanda); cepa BCG 1, australiana (ATCC 35739); BCG 3, Chicago (ATCC 27289); BCG 4, Connaught (CDC); BCG 7, Copenhagen (ATCC 27290); BCG 8, danesa (CPCIDCD 1331); BCG 10, francesa (CPCIDCD 1173 P2); BCG 11, Glaxo (CPCIDCD F10); BCG 14, japonesa (ATCC 35737); BCG 16, mexicana (ATCC 35738); BCG 17, Montreal (ATCC 35735); BCG 18, Moreau (CPCIDCD); BCG 20, Pasteur (ATCC 27291); BCG 21, rusa (ATCC 35740); BCG sueca (ATCC 35732) del UTT (EEUU) y tres cepas de Queensland (Australia).
Micobacteria aislada de pinnípedos (<i>seal bacillus</i>)	16	Cepas aisladas de pinnípedos australianos salvajes de Tasmania (1), Bremer (1) y Albany (2), y animales de un parque acuático (11 cepas aisladas de 5 animales) y de su cuidador (1).
<i>M. microti</i>	3	Cepa de referencia NTCT 08710 (Suecia) y cepas de Reino Unido aisladas de ratones (2).
Micobacteria aislada de hyrax (<i>dassie bacillus</i>)	4	Cepas aisladas de Hyrax mantenidos en un zoo de Australia (2), de Suecia (1) y de Reino Unido (1).
<i>M. tuberculosis</i>	1	Cepa de referencia H37Rv.

3. RESULTADOS

3.1. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN

La extracción proporcionó ADN de buena calidad pero en cantidad muy variable dependiendo de las cepas (Figura IV.1), siendo en un 26,1% de las cepas insuficiente para su caracterización mediante RFLP. Este escaso rendimiento puede atribuirse principalmente a un deficiente crecimiento debido a una viabilidad reducida (cepa vieja o dañada). Sin embargo, debido a la alta sensibilidad del PCR, si se obtuvieron resultados en estas cepas al caracterizarlas mediante DVR-spoligotyping.

3.2. ADAPTACIÓN DEL MÉTODO EN NUESTRO LABORATORIO

3.2.1. Evaluación del primer marcado con biotina

Las dos parejas de iniciadores amplificaron correctamente el ADN inoculado en ambos grupos de tubos, no observándose diferencias en la amplificación entre ambos. Puesto que el producto de la reacción obtenido es una mezcla de fragmentos amplificados de diferentes tamaños moleculares en el gel se observó una lengua de ADN y no bandas diferenciadas. En los tubos inoculados con agua MQ como control negativo no existe amplificación (Figura IV.2).

Sin embargo, al realizar la detección de los productos de PCR fijados a la membrana se encontraron diferencias significativas. Las señales producidas por los iniciadores preparados por Oswell eran mucho más intensas, permitiendo la detección de 1 µl de la dilución 10^{-3} del producto de PCR (aproximadamente 2,4 pg de iniciador), frente a la dilución 10^{-2} de los iniciadores preparados por Biotech International (Figura IV.2).

3.2.2. Concentración del conjugado *streptavidin-peroxidase* y exposición

Los resultados obtenidos con 5 µl de *streptavidin-peroxidase conjugate* (Boehringer Mannheim) en 10 ml 2x SSPE/0,5% SDS fueron superiores a los obtenidos con 2,5 µl, no

existiendo una mejoría notable al aumentar esta concentración. El tiempo de exposición apropiado fue de 12 a 15 minutos; y no se observó una mayor intensidad con tiempos de exposición más prolongados, decayendo la intensidad de la señal rápidamente tras este periodo inicial.

3.3. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE DVR-SPOLIGOTYPING DE LAS CEPAS DE *M. bovis*

En la caracterización mediante DVR-spoligotyping de las 199 cepas de *M. bovis* estudiadas se identificaron 26 patrones diferentes. Todas las cepas, excepto la RC17, de origen humano, carecieron de los espaciadores 39-43, una propiedad característica que diferencia *M. bovis* de *M. tuberculosis* (Figuras IV.3 y IV.4). En la realización de algunas pruebas el espaciador 42 mostró una reacción débil, pero debido a que los resultados que ofrecía eran inconsistentes (algunas veces negativo, otras débilmente positivo), fue finalmente considerado negativo.

Con las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG P3, utilizadas como controles, se obtuvieron siempre los mismos resultados en todos los tests. La relación entre estas cepas fue superior al 65%. En algunas ocasiones, aunque no se obtuvo nunca amplificación en el control negativo, si aparecieron las bandas equivalentes a algunos espaciadores tras la detección. Sin embargo, este falso positivo no afectó a los resultados de las cepas, ya que los patrones obtenidos no se alteraron al repetir las caracterizaciones.

Los spoligotipos se clasificaron en dos grupos principales; el primero, formado por 22 spoligotipos, contiene las cepas humanas y las aisladas del ganado vacuno, de los animales salvajes y de los gatos; el segundo, con 4 spoligotipos, engloba las cepas de origen caprino y ovino. Dentro de cada uno de estos grupos, los patrones de las cepas difieren sólo ligeramente. Estos resultados sugieren que los patrones de los spoligotipos pueden ser característicos de las cepas de *M. bovis* que infectan a las diferentes especies animales (Figuras IV.5 y IV.6).

3.4. SPOLIGOTIPOS DE CEPAS DE *M. bovis* AISLADAS DE GANADO VACUNO

Todas las cepas de *M. bovis* aisladas del ganado vacuno investigadas carecen de los espaciadores 3, 9 y 16, y poseen los espaciadores 1, 13, 18, 23, 25, 30 y 38. El método clasificó las 129 cepas en 18 spoligotipos (spb-1 a spb-18) (Tabla IV.6). El más frecuente fue el spb-7; se encontró en 59 cepas (45,7%) pertenecientes a 15 granjas (44,1%) repartidas por todo el territorio. Este tipo pudo ser diferenciado en 11 tipos de RFLP con IS6110 utilizando los resultados obtenidos con las sondas RHS y LHS. Los tipos spb-3 y spb-13 fueron el segundo y tercer tipo más comunes, ambos aparecieron en 14 animales de cinco rebaños en diferentes áreas geográficas. Pudieron ser diferenciados en dos [1A (1A), 12A] y tres [1A (1C), 1A (1D), 7B] tipos IS6110, respectivamente. La cepa control *M. bovis* BCG P3 perteneció también al tipo spb-3. El tipo spb-8 se encontró en cuatro granjas. Otros spoligotipos se hallaron en cepas aisladas de una o dos granjas.

En algunas granjas todas las cepas aisladas de sus animales presentaban el mismo patrón, mientras que en otras granjas aparecieron cepas con patrones diferentes. Las investigaciones de seguimiento realizadas en algunas granjas pueden ofrecer una posible razón a este hecho. En las granjas b-5, b-9, b-11 y b-13, en donde se obtuvieron cepas de *M. bovis* con diferentes spoligotipos, se habían detectado animales positivos a la prueba de la intradermorreacción desde hace varios años, y los propietarios acostumbran a comprar y vender ganado frecuentemente. Sin embargo, el rebaño b-2 estaba libre de tuberculosis hasta la aparición de un brote; las doce cepas originarias de vacas de la explotación compartían el mismo patrón spb-1. En muchos casos fué imposible establecer una relación epidemiológica que explicara la aparición de un mismo spoligotipo en varias granjas, ya que no suele existir control de los animales. Por ejemplo, cepas procedentes de las granjas b-6, b-9 y b-11 compartían el patrón spb-8, pero los propietarios no recuerdan la existencia de intercambio de ganado entre ellos, bien debido a la separación geográfica (entre las granjas b-9 y b-11) o por el tipo de ganado (diferente calidad genética entre los animales de las granjas b-6 y b-11).

Cuarenta y nueve de los 97 (51%) aislados bovinos con patrón conocido de IS6110-

RHS tienen una única copia de este elemento (patrón 1A), situado en un fragmento de 1,9 Kb al digerir con la enzima de restricción *PvuII*; este tipo estuvo presente en 19 de 27 granjas (70,4%). Con la sonda para IS6110-LHS fueron agrupadas en cuatro grupos (1A, 1B, 1C, y 1D). La técnica de spoligotyping diferencia nueve tipos en este grupo: spb-3, spb-4, spb-5, spb-6, spb-7, spb-8, spb-9, spb-13 y spb-17. Si se combinan los resultados de la tipificación mediante DVR-spoligotyping y de RFLP con IS6110, las cepas de *M. bovis* aisladas de ganado vacuno pueden clasificarse en 30 tipos diferentes.

3.5. SPOLIGOTIPOS DE CEPAS DE *M. bovis* AISLADAS DE GANADO CAPRINO Y OVINO

Los spoligotipos obtenidos de las cepas de *M. bovis* aisladas de las cabras y de la oveja fueron muy similares, y claramente diferentes de los patrones de las cepas del ganado vacuno. Las principales características comunes de estos patrones fueron la ausencia de los espaciadores 1, 3-16, 28 y 30-33; y la presencia de los 17, 18, 20, 21, 24-27, 29, 35 y 37-38.

El spoligotyping clasificó las 45 cepas en cuatro tipos (spc-1 a spc-4) (Tabla IV.7); el RFLP con IS6110 clasificó 31 de éstas en 5 tipos. Con excepción de dos individuos, todos los animales de una propiedad estaban infectados con *M. bovis* con el mismo spoligotipo. El mayor de estos grupos, el tipo spc-3, comprendió 26 animales de las granjas c-1, c-2 y c-3; todas estas cepas pertenecieron al tipo IS6110 6B. La distribución de un mismo patrón en diferentes granjas puede deberse al intercambio de animales entre ganaderos vecinos. Dentro de cada uno de los spoligotipos spc-1 y spc-2 se identificaron dos patrones IS6110.

El patrón spc-1/5A (spoligotipo/tipo IS6110) se observó en el rebaño c-5, y el patrón spc-1/6C se encontró en todas las cepas del rebaño c-8 y en la única cepa de la granja c-7. Tras algunas averiguaciones, supimos que la cabra de la granja c-7 había sido adquirida en la granja c-8 un año antes del diagnóstico de la enfermedad. El spoligotipo spc-2/8A se encontró en las cepas provenientes de la granja c-4, y el spc-2/6A en los animales de la granja c-6. El tipo spc-4, muy parecido al spc-3, se observó únicamente en una cepa aislada de una cabra de la granja c-1. La cepa ovina mostró el mismo patrón que los obtenidos con

las cepas de la granja de ganado caprino c-6.

La combinación de los resultados de ambos métodos de tipificación clasificó las cepas caprinas y ovina de *M. bovis* en seis tipos diferentes.

3.6. SPOLIGOTIPOS DE CEPAS DE *M. bovis* AISLADAS DE VARIAS ESPECIES ANIMALES

Los resultados de la tipificación mediante spoligotyping de las cepas de *M. bovis* aisladas de los jabalíes, los ciervos y los gatos se muestran en la tabla IV.8. El patrón spb-6, encontrado en tres de las cuatro cepas de jabalíes, se había encontrado también en una cepa proveniente de la granja de ganado vacuno b-9. El tipo IS6110 de estas cepas era el común 1A. La cepa aislada del cuarto animal perteneció al frecuente spb-7. Las cepas de los ciervos fueron ambas del tipo spb-15, hallado en las granjas b-21 y b-22. Aunque fué imposible establecer una relación epidemiológica definitiva, la transmisión de *M. bovis* de los animales salvajes al ganado (o viceversa) pudo haber tenido lugar al compartir los mismos pastos.

Los spoligotipos obtenidos de las cepas aisladas de los gatos domésticos no se encontraron en otros animales. La cepa de *M. bovis* spb-19, aislada del primer gato, fue bastante similar al obtenido con las cepas del ganado vacuno, coincidiendo en la presencia y ausencia característica de determinados espaciadores; sin embargo, el spoligotipo de la cepa del segundo gato, spb-20, demostró diferencias bastante significativas.

3.7. SPOLIGOTIPOS DEL BROTE HUMANO DE *M. bovis* MULTIRRESISTENTE

Dieciséis de las diecisiete cepas de *M. bovis* multirresistente mostraron exactamente el mismo patrón. Las características principales coincidieron con las de *M. bovis* (ausencia de los espaciadores 39 a 43) y con las cepas de *M. bovis* españolas de origen bovino respecto a la existencia de determinados espaciadores (ausencia del 3, 9 y 16, y presencia del 1, 13 18, 23, 25, 30 y 38). En el estudio mediante RFLP de estas cepas con IS6110, se observaron 2 o 3 copias de este elemento. El patrón obtenido con la cepa restante (RC13) fué totalmente

diferente, conteniendo los espaciadores 1 a 19, 22 a 28 y 43. La repetición de la identificación convencional comprobó que la cepa no pertenecía al brote, y que era una contaminación en el laboratorio.

3.8. SPOLIGOTIPOS DE CEPAS DE VARIAS MICOBACTERIAS DEL COMPLEJO *M. tuberculosis*

La mayoría de las cepas de *M. bovis* de origen humano de la colección de cultivos del Australian Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis presentaron las características propias de los *M. bovis* ya estudiados (Figura IV.7). Todas las cepas de *M. bovis* BCG mostraron el mismo patrón, coincidente con el tipo spb-3, encontrado en algunas cepas bovinas españolas (Figura IV.8).

Las cepas de las micobacterias aisladas de pinnípedos, independientemente de su origen geográfico, presentaron un mismo patrón, en el que estaban presentes los espaciadores 4 a 7 y 23 a 38, concordando con las cepas de *M. bovis* estudiadas en la ausencia de las bandas correspondientes a los espaciadores 39 a 43 (Figura IV.9).

Los spoligotipos de la cepa de referencia de *M. microti* NTCT 08710 y las dos cepas aisladas de casos clínicos de ratones (3377 y 3381) fueron idénticos, conteniendo únicamente los espaciadores 37 y 38. Las cepas de micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* aisladas de hyrax o dassie (*Procavia capensis*) en Sudáfrica, conocidos como *dassie bacillus* (7171 y TB23/91SW), tuvieron los espaciadores 1 a 6, 8, 10 a 14, y 17 a 19. Las cepas de *dassie bacillus* obtenidas a partir de las muestras de animales de una colonia de estos roedores, importada de Sudáfrica y mantenida en el zoo de Perth (Western Australia) presentaron los espaciadores 1 a 6, 8, 10 a 14 y 17 a 19; existiendo una relación entre estas cepas y las anteriores del 90%, mientras que la relación entre el grupo de los *dassie bacillus* y las cepas de *M. microti* fué inferior al 20%. En ninguna de estas cepas se obtuvieron los espaciadores 39 a 43 (Figura IV.10).

Tabla IV.6. Patrones obtenidos en la caracterización mediante DVR-spoligotyping y RFLP con IS6110 de las cepas de *M. bovis* aisladas de ganado vacuno.

Spoligotipo	Tipo IS6110 ^a	Granja	No. de cepas
spb-1	7A	b-2	12
spb-2	5B	b-1	1
spb-3	1A(1A)	b-23	1
	1A(1A)	b-29^b	1
	2A	b-29	1
	12A	b-4	3
	- ^c	b-17	4
	-	b-23	3
	-	b-33	1
spb-4	1A(1C)	b-5	1
spb-5	1A(1A)	b-13	3
	-	b-13	1
spb-6	1A(1B)	b-9	1
spb-7	1A(1A)	b-7	2
	1A(1A)	b-8	1
	1A(1A)	b-12	1
	1A(1A)	b-32	19
	1A(1B)	b-20	1
	1A(1B)	b-26	1
	1A(1D)	b-31	3
	1D	b-11	1
	2A	b-29	13
	2B	b-32	1
	3A	b-29	3
	3B	b-29	1
	3C	b-29	1
	4A	b-24	1
	5C	b-30	1
	5D	b-24	1
	-	b-24	1

(Continuación)

Spoligotipo	Tipo IS6110	Granja	No. de cepas
spb-7	-	b-25	1
	-	b-26	2
	-	b-27	1
	-	b-32	1
	-	b-33	1
	-	b-34	1
spb-8	1A(1B)	b-6	1
	1A(1B)	b-9	3
	1A(1B)	b-11	1
	-	b-28	2
spb-9	1A(1A)	b-16	1
	1A(1A)	b-33	1
spb-10	6D	b-15	1
spb-11	-	b-27	1
spb-12	1C	b-3	1
spb-13	1A(1C)	b-5	1
	1A(1C)	b-10	3
	1A(1D)	b-14	1
	1A(-)	b-19	1
	7B	b-18	1
	-	b-18	4
	-	b-19	3
spb-14	11A	b-12	1
spb-15	-	b-21	4
	-	b-22	1
spb-16	4B	b-11	1
spb-17	1A(1B)	b-13	1
spb-18	1B	b-33	3

^a El número del tipo de RFLP representa el número de bandas que hibridaron con la secuencia IS6110 al utilizar la sonda RHS. Entre paréntesis se encuentra el tipo obtenido con la sonda LHS. Los resultados del RFLP corresponden con los previamente publicados (Liébana, 1996).

^b Granjas en las que se encontró más de un spoligotipo (en negrita).

^c No disponible.

Tabla IV.7. Patrones obtenidos en la caracterización mediante DVR-spoligotyping y RFLP con IS6110 de las cepas de *M. bovis* aisladas de ganado ovino y caprino.

Spoligotipo	Tipo IS6110 ^a	Granja	No. de cepas
spc-1	5A	c-5	2
	6C	c-7	1
	6C	c-8	5
	- ^b	c-2^c	1
spc-2	6A	c-6	1
	6A	o-1	1
	8A	c-4	2
	-	c-4	1
	-	c-6	4
spc-3	6B	c-1	6
	6B	c-2	12
	6B	c-3	1
	-	c-1	4
	-	c-2	2
	-	c-3	1
spc-4	-	c-1	1

^a El número del tipo de RFLP representa el número de bandas que hibridaron con la secuencia IS6110 al utilizar la sonda RHS. Los resultados del RFLP corresponden con los previamente publicados (Liébana, 1996).

^b No disponible.

^c Granjas en las que se encontró más de un spoligotipo (en negrita).

Tabla IV.8. Patrones obtenidos en la caracterización mediante DVR-spoligotyping y RFLP con IS6110 de las cepas de *M. bovis* aisladas de diferentes especies animales.

Spoligotipo	Tipo IS6110 ^a	Animal	No. de cepas
spb-6	1A (1B)	jabalíes 1-3	3
spb-7	- ^b	jabalí 4	1
spb-15	-	ciervos	2
spb-19	1A (1A)	gato no. 1	1
spb-20	-	gato no. 2	1

^a El número del tipo de RFLP representa el número de bandas que hibridaron con la secuencia IS6110 al utilizar la sonda RHS. Entre paréntesis se encuentra el tipo obtenido con la sonda LHS. Los resultados del RFLP corresponden con los previamente publicados (Liébana, 1996).

^b No disponible.

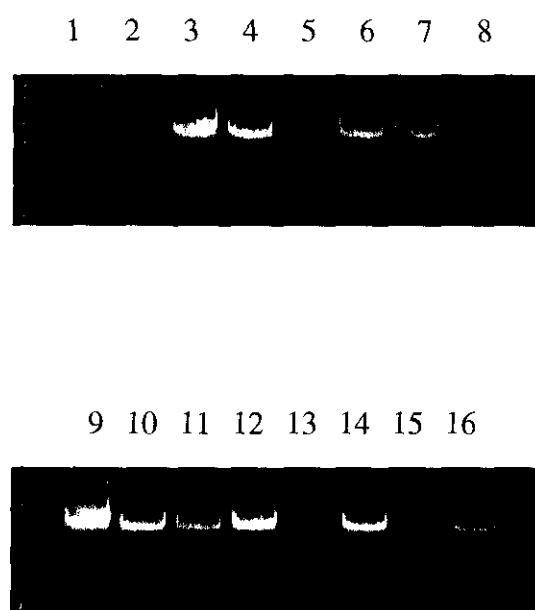


Figura IV.1. Estimación de la concentración de ADN mediante electroforesis de 1 μ l en gel de agarosa al 0,8%. Una banda muy fuerte, como las observadas en las calles 3 y 9 (cepas LO133 y S4), equivale a 1 μ g/ μ l; las bandas de menor intensidad de las calles 4 y 7 (LO134 y LO156) y en la calle 6 (LO142) equivalen respectivamente a 0,8 y 0,6 μ g/ μ l. Las bandas débiles, semejantes a las calle 10 y 11 (CAM2 y M1) y calles 5 y 8 (LO135 y P24) representan 0,5 y 0,4 μ g/ μ l. La calle 16 (cepa 1923), muy débil, tiene 0,2 μ g/ μ l y la 15 (4/21) 0,1 μ g/ μ l. No se observa ADN en la calle 13 (46c).

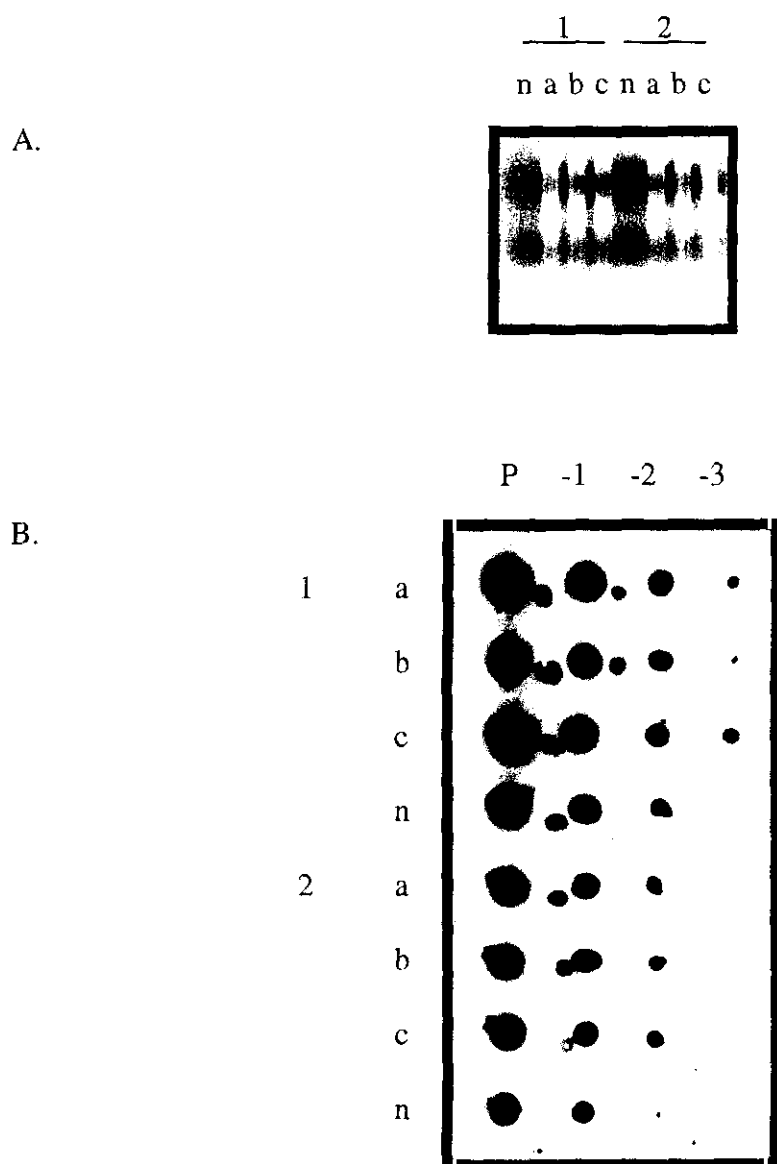


Figura IV.2. Detección mediante electroforesis en gel de agarosa (A), y con el conjugado streptavidin-peroxidasa (B) de los productos de la amplificación obtenida con los iniciadores HDR-F y HDR-RB preparados por 1, Oswell, y 2, Biotech. La calle a, *M. tuberculosis* H37Rv; b, *M. bovis* (cepa aislada de una vaca de Canadá); c, micobacteria aislada de una foca en Australia; n, amplificación de agua ultrapura estéril. Calle P, producto de PCR sin diluir; -1, -2 y -3 representan las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .

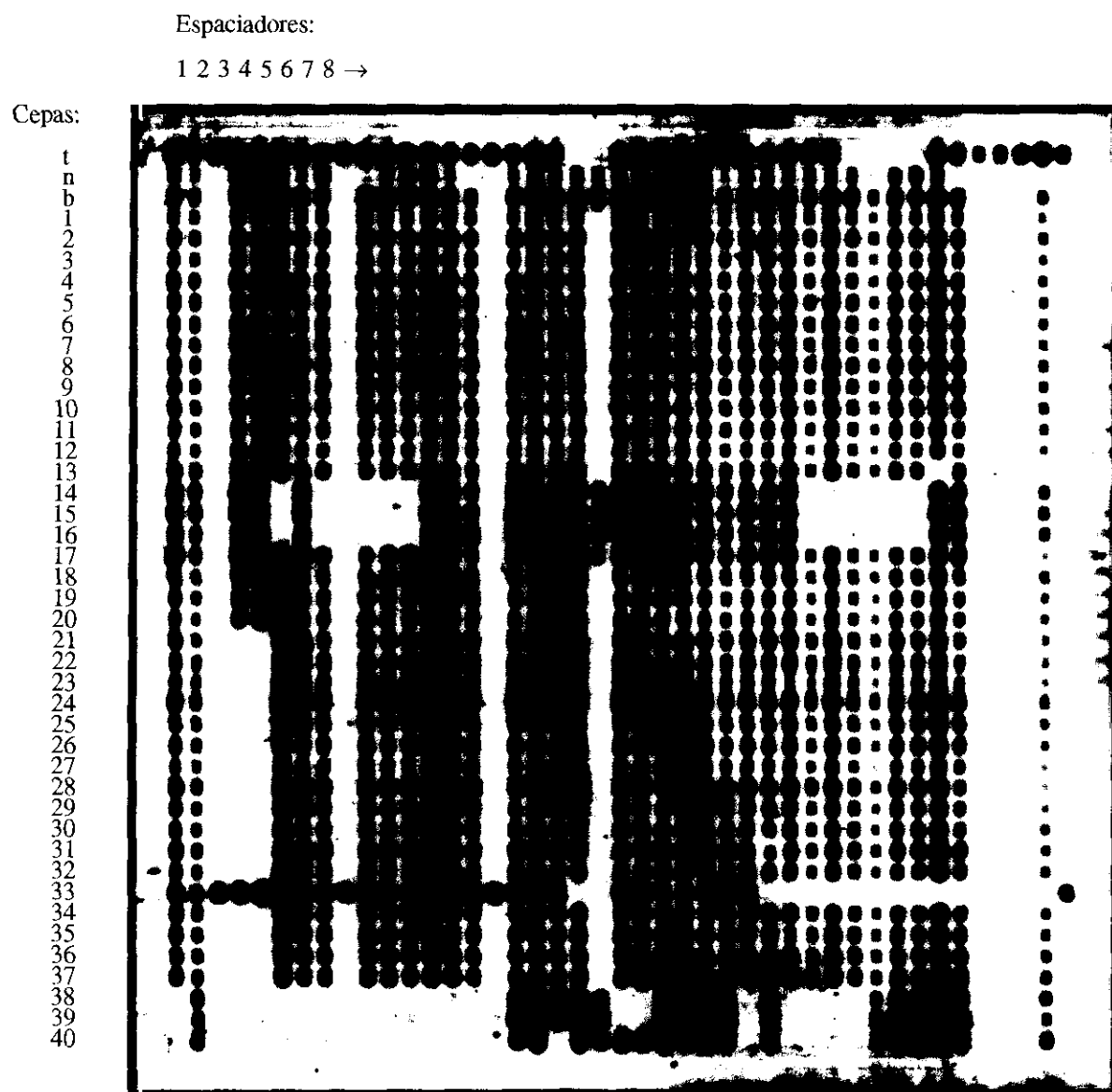


Figura IV.3. Resultados de la caracterización mediante DVR-spoligotyping de cepas de *M. bovis* de diferentes orígenes. Calles t y b, cepas control *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG P3; n, control negativo. Cepas 1 a 20, *M. bovis* de origen bovino de la granja b-32: 1 a 12, B370, B382, B386, B246, B265, B277, B405, B416, B425, B428, B435 y B242; granja b-33: 13 a 18, B293, B304, B302, B270, B268, B315; granja b-34: 19, B443; y granja desconocida: 20, B291 (cepa no incluída en el estudio). Cepas 21 a 37 (RC1 a RC17), *M. bovis* de origen humano procedentes de un brote nosocomial multirresistente. Cepas 38 a 40, *M. bovis* de origen caprino de las granjas c-3: 39 y 40, 1923 y 463; y c-4: 40, 4/21.

Espaciadores:

$$1\ 2\ 3\ 4\ 5\ 6\ 7\ 8 \rightarrow$$

Cepas:

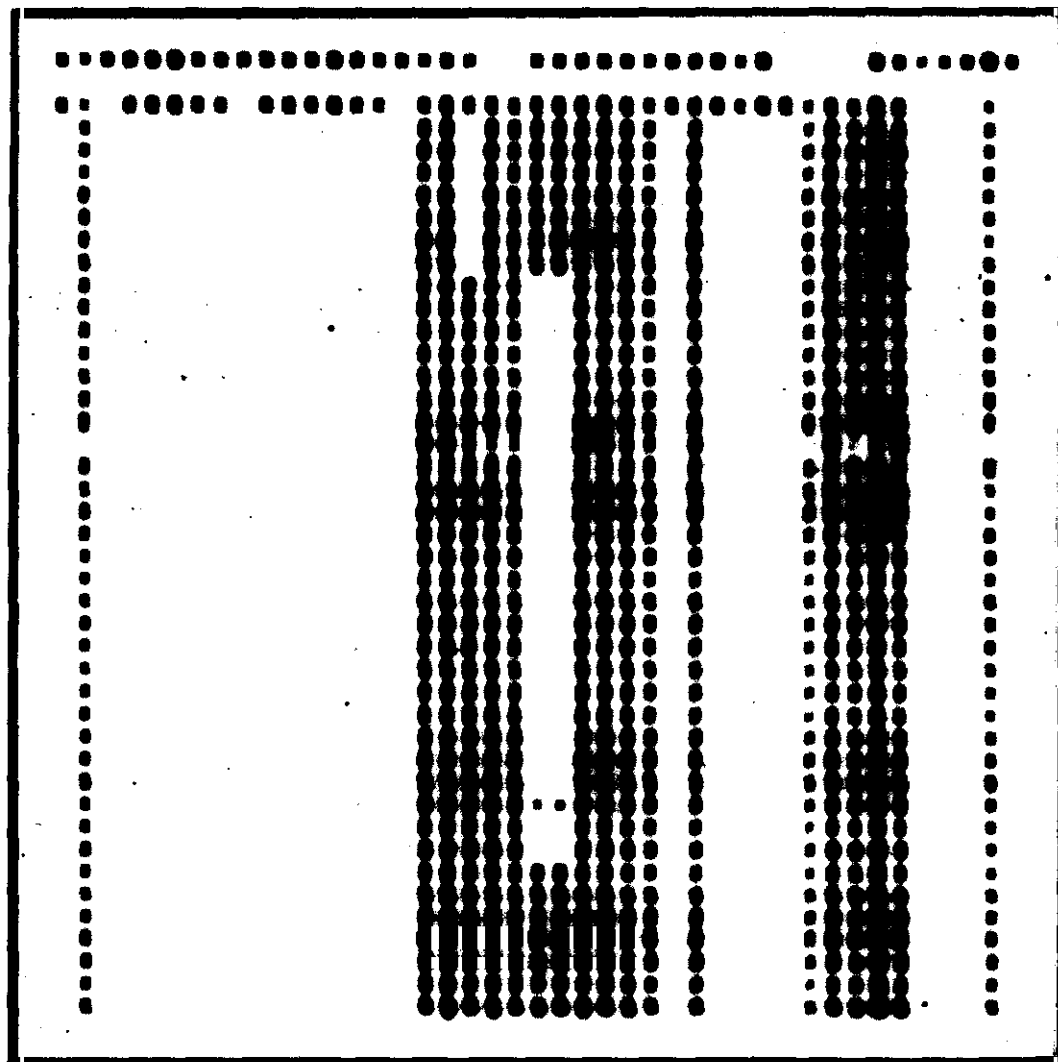
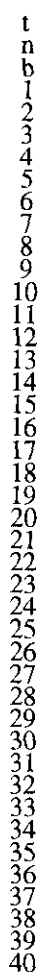


Figura IV.4. Resultados de la caracterización mediante DVR-spoligotyping de cepas de *M. bovis* de origen caprino. Calles t y b, cepas control *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG P3; n, control negativo. Cepas 1 a 40, *M. bovis* procedentes de animales de la granja c-4: 1, cepa 4/6 y 2, 4/1; granja c-6: de 3 a 7, 57c, 25c, 45c, 39c y 46c; granja c-1: de 8 a 18, CB35, CB22, CB23, CB70, CB76, CB61, CB26, CB3, CB20, CB11 y CB27; c-2: de 19 a 33, CB56, CB38, CB57, CB6, CB28, CB29, CB7, CB21, CB9, CB8, CB52, CB32, CB54, CB40 y CB58; c-5: 34, CB82; 35, CB83; granja c-7: 36, CAM2; y granja c-8: de 37 a 40, c300/95, COL1, COL3 y COL4.

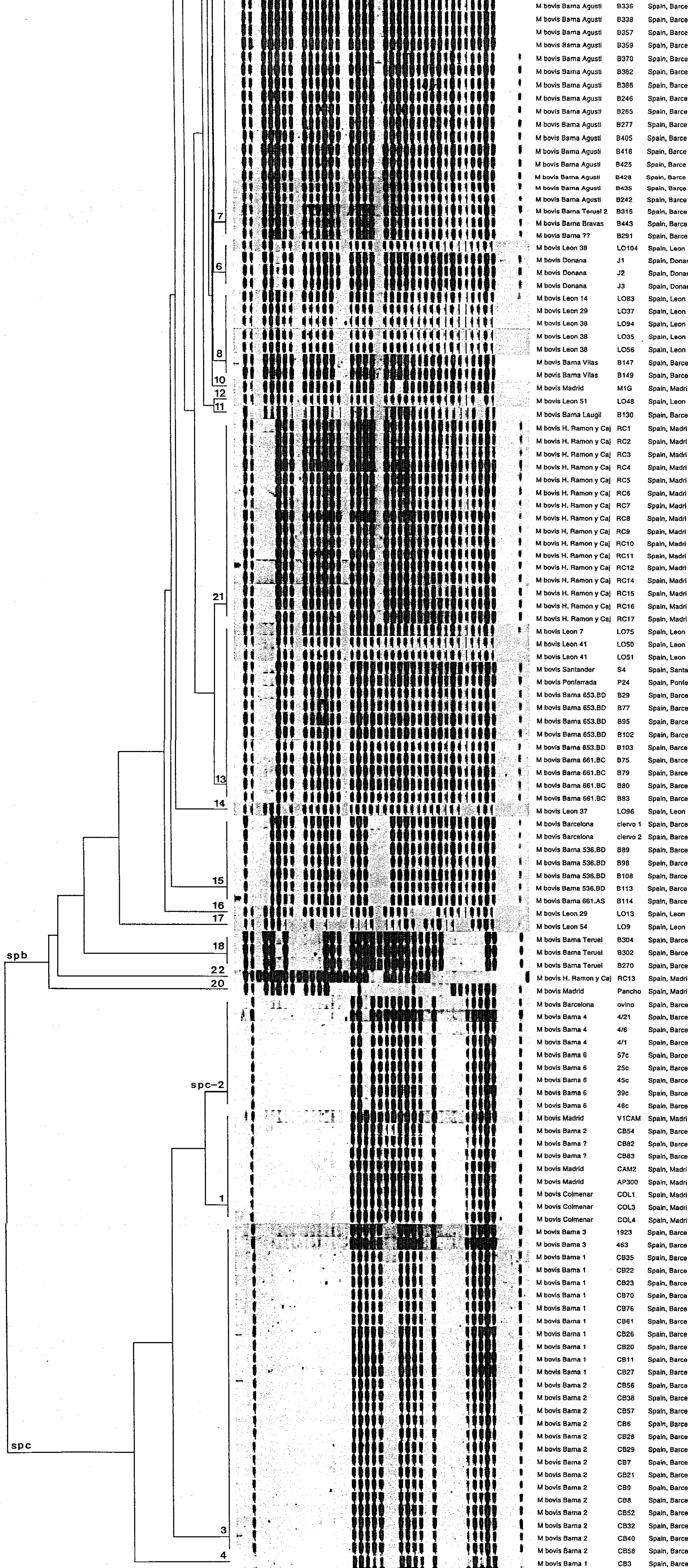


Figura IV.5. Dendrograma de los 26 patrones identificados mediante DVR-spoligotyping en las 199 cepas de *M. bovis* españolas aisladas de seres humanos (brote nosocomial), ganado vacuno, caprino y ovino, gatos domésticos, ciervos y jabalíes.

List: spainspo

Entries: 200

Correlation: Bands, Jaccard (Max. tol. 0.8%, Min. surf. 0.0%)

Zones: [1-400]

Clustering: NJ

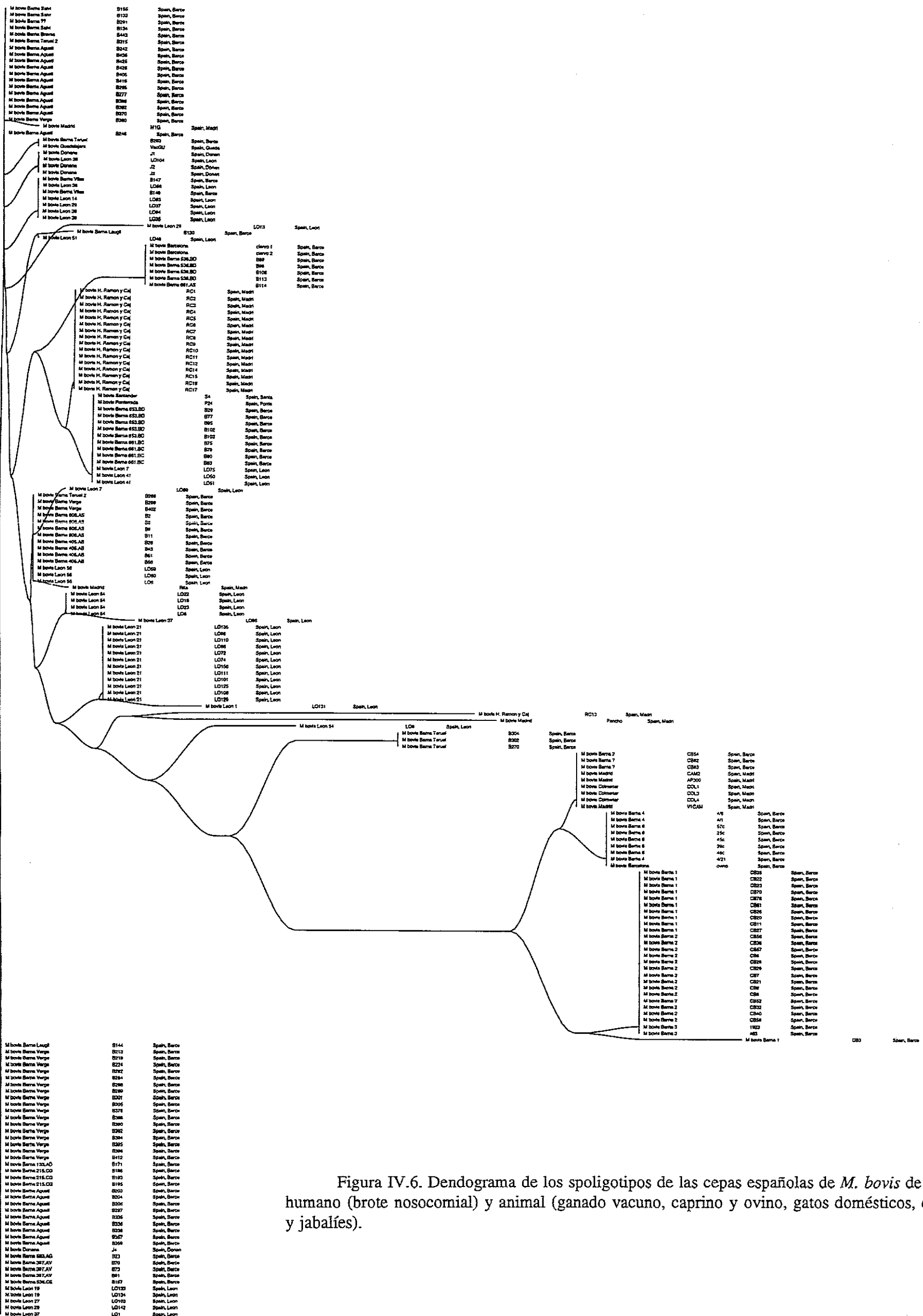


Figura IV.6. Dendrograma de los spoligotipos de las cepas españolas de *M. bovis* de origen humano (brote nosocomial) y animal (ganado vacuno, caprino y ovino, gatos domésticos, ciervos y jabalíes).

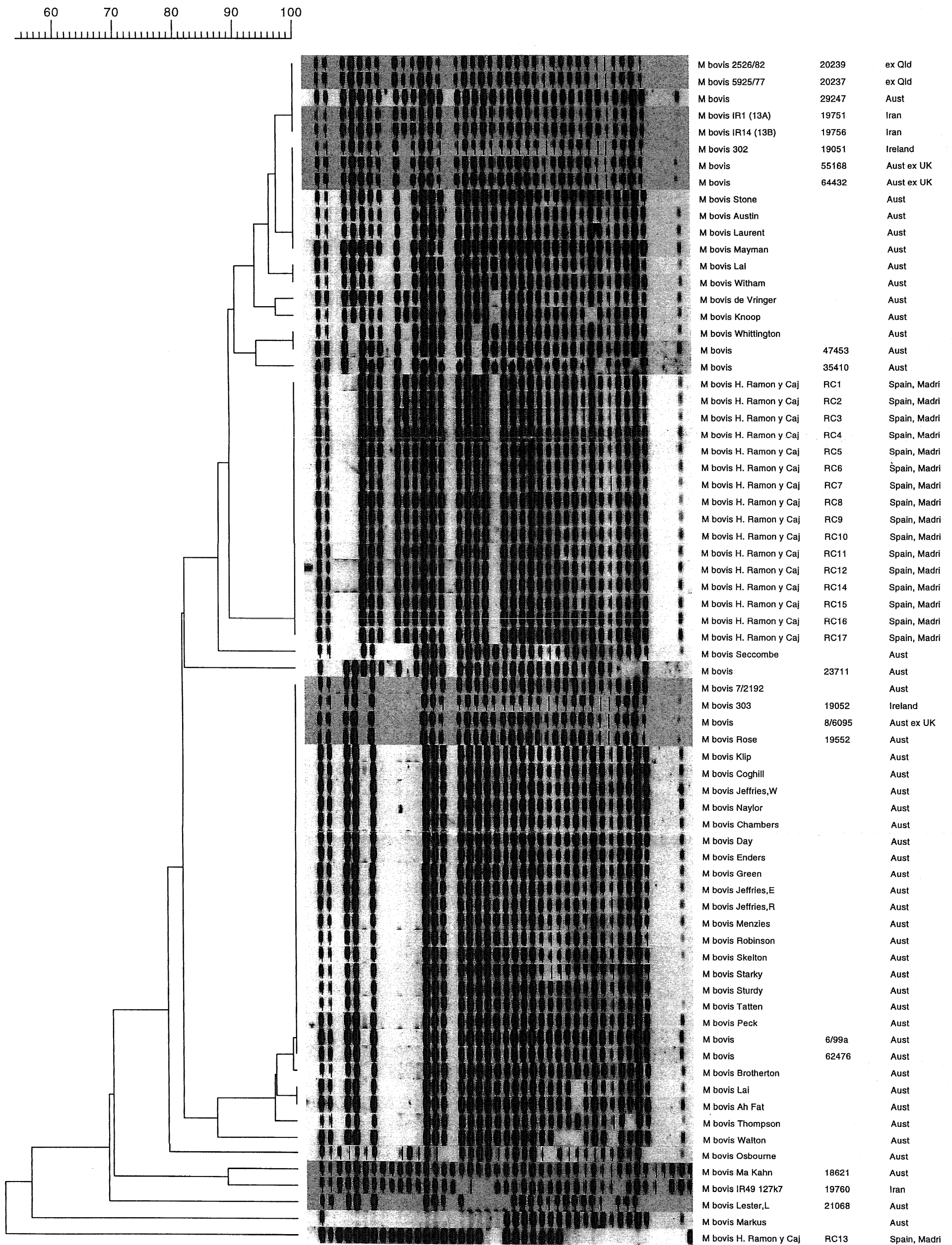


Figura IV.7. Resultados de DVR-spilotyping de cepas de *M. bovis* aisladas de seres humanos de Australia, Irán, Irlanda, Reino Unido y España.

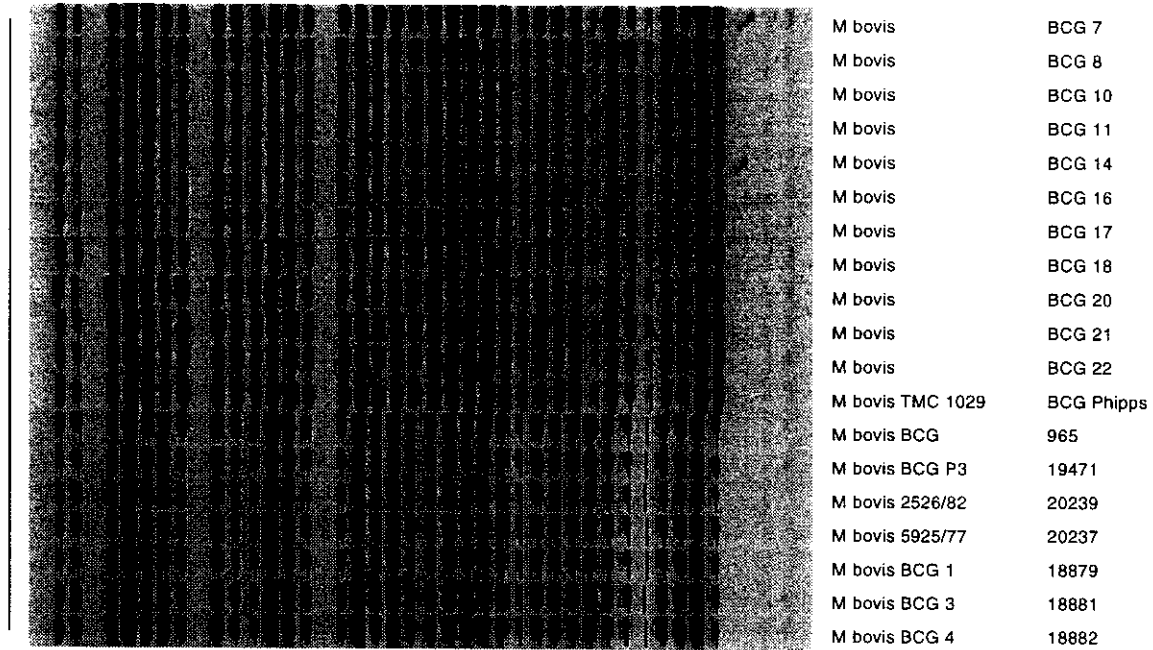
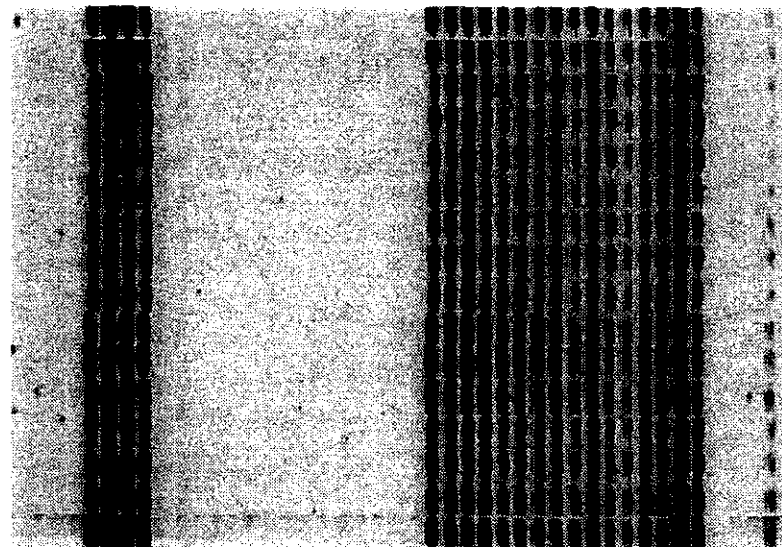


Figura IV.8. Caracterización mediante DVR-spilotyping de cepas de *M. bovis* BCG de diferentes orígenes (Tabla IV.5).



M seal Atlantis	6482	Aust WA
M seal Atlantis	6481	Aust WA
M seal Atlantis	6510	Aust WA
M seal Atlantis	6954	Aust WA
M seal Atlantis	6884	Aust WA
M seal Atlantis	6866	Aust WA
M seal 4824G	ex 6841	Aust WA
M seal 4823F	ex 6841	Aust WA
M seal 4821D	ex 6842	Aust WA
M seal 4524D	ex 6841	Aust WA
M seal 1676	ex 6842	Aust WA
M seal wild ex Albany	14109	Aust WA
M seal wild ex Bremer	14126	Aust WA
M seal wild ex Albany	20296	Aust WA
M seal seal trainer	146-D	Aust WA
M seal wild ex Tas	92/1162/TAust WA	

Figura IV.9. Resultados de la caracterización mediante DVR-spoligotyping de cepas del complejo *M. tuberculosis* aisladas de pinnípedos (Tabla IV.5).

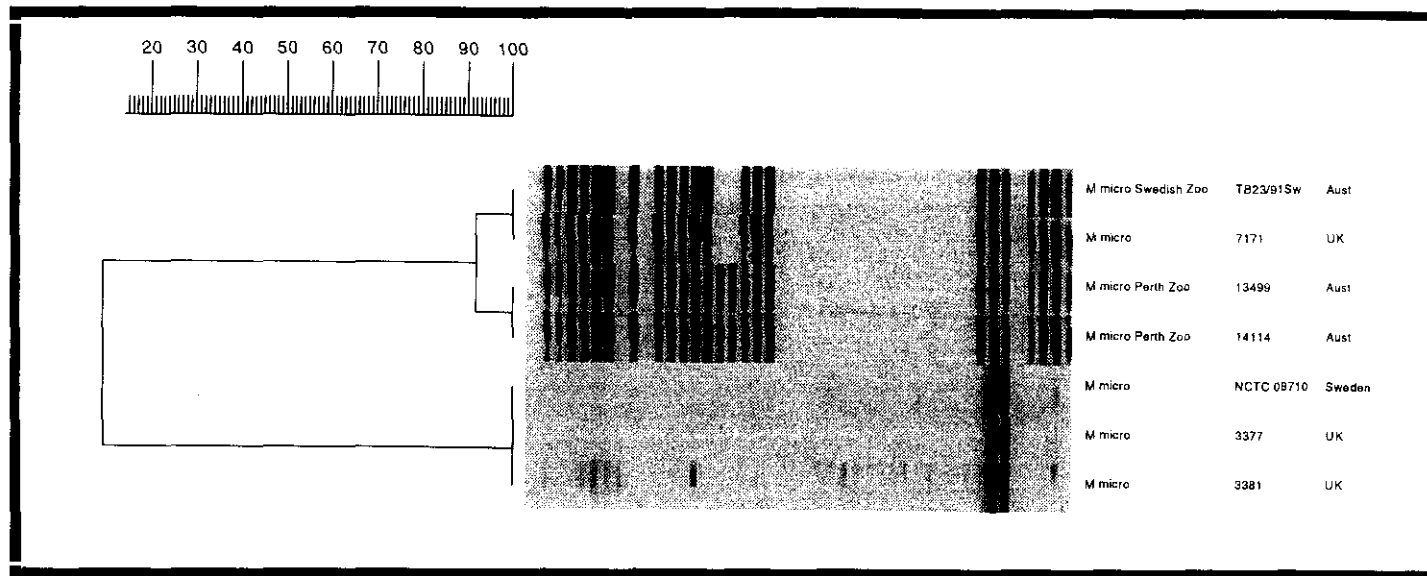


Figura IV.10. Dendrograma de los resultados de la caracterización mediante DVR-spoligotyping de *M. microti* y de cepas del complejo *M. tuberculosis* aisladas de hyrax (Tabla IV.5).

4. DISCUSIÓN

La capacidad para identificar y caracterizar diferentes organismos estrechamente relacionados puede ser útil para el estudio de la epidemiología, virulencia y resistencia a antibióticos (Shoemaker et ál, 1986). La epidemiología molecular integra las técnicas moleculares con los métodos tradicionales para "seguir la pista" a cepas específicas de patógenos, con el objetivo de comprender la distribución de la infección en la población (van Embden et al, 1992), permitiendo la comparación de las cepas de un brote con los tipos existentes en el área geográfica, el establecimiento de la fuente de los nuevos casos detectados, y el estudio de la transmisión de la infección. Se consideran clones los cultivos bacterianos aislados independientemente de diferentes fuentes y en diferentes momentos, pero mostrando entre sí características fenotípicas y genotípicas idénticas, y cuya explicación es un antecesor común (Small et ál, 1994). Sin embargo, la definición de clonalidad depende básicamente del método de caracterización utilizado.

Las principales consideraciones para determinar la utilidad de un método de tipificación son la reproducibilidad, asociada a la calidad de las muestras, y la especificidad (Crawford, 1993). En el caso del RFLP, ésta está estrechamente relacionada con el número de copias. Para ser válido un patrón de RFLP debe estar formado por suficientes fragmentos de diferentes pesos moleculares para obtener una adecuada discriminación entre cepas, pero siendo lo suficientemente sencillo para permitir un análisis comparativo. La discriminación mediante RFLP asociado a *IS6110*, el método de tipificación más generalizado, es muy débil para las cepas con un bajo número de copias, debido a que en el cromosoma parecen existir puntos de integración preferentes (Hermans et ál, 1991; van Soolingen et ál, 1993). Así, a menor número de copias, menor diversidad genética; y en algunas regiones del mundo tampoco puede utilizarse como herramienta epidemiológica (Yuen et ál, 1993).

En la caracterización de la región que contiene las secuencias DR (Hermans et ál, 1991) se encontró que la región contenía múltiples DR de 36 p.b., intercaladas por espaciadores de ADN de 36 a 41 p.b. El polimorfismo entre las diferentes cepas comprende la presencia o ausencia de uno o más bloques denominados DVR, formados por una secuencia DR y un espaciador. El grado de polimorfismo observado en esta región cromosómica puede

deberse a la contribución de dos tipos de reorganización, la recombinación homóloga y la mediada por secuencias de inserción (Groenen et ál, 1993). El DVR-spoligotyping (Kamerbeek et ál, 1995) es un método diseñado para detectar los espaciadores presentes en una cepa, originalmente propuesto para la detección y tipificación de cepas de *M. tuberculosis* (Kamerbeek et ál, 1996).

Mediante la caracterización epidemiológica de 199 cepas de *M. bovis* utilizando el método DVR-spoligotyping se encontraron 26 tipos diferentes. Este método tiene un alto nivel de discriminación, permitiéndonos descubrir varias relaciones epidemiológicas. Algunos spoligotipos estuvieron restringidos a pequeñas áreas, formando un grupo endémico de cepas relacionadas; mientras que la distribución geográfica de otros cubrió más territorio, debido probablemente al comercio de ganado, principalmente vacuno lechero. El método utilizado permitió el establecimiento de tipos relacionados con determinadas especies animales, detectar la fuente de infección de algunos casos y la transmisión de la infección entre animales y entre granjas.

Varios autores han sugerido que los diferentes reservorios animales de *M. bovis* pueden estar infectados con diferentes tipos de *M. bovis*, dependiendo del hospedador (van Soolingen et ál, 1994). Al utilizar el spoligotyping para recoger información de las cepas involucradas en la tuberculosis bovina y caprina en España todas las cepas se agruparon en dos grupos; el primero contiene las cepas aisladas de seres humanos, de ganado vacuno, animales salvajes y gatos; el segundo las cepas obtenidas de ganado caprino y ovino. Dentro de cada uno de estos grupos, los patrones de los spoligotipos encontrados son bastante similares, indicando infección con un grupo homogéneo de *M. bovis* o que la región de espaciadores identificada por este método es muy estable. La relación entre ambos grupos fue del 60%, inferior a la existente entre *M. bovis* BCG P3 y *M. tuberculosis* H37Rv.

Al evaluar la utilidad del método en la diferenciación de 129 cepas de *M. bovis* de origen vacuno, estas se agruparon en 18 tipos. En este estudio, encontramos que este método de tipificación es adecuado para la caracterización epidemiológica de *M. bovis*, especialmente de aquellas cepas que contienen solamente un elemento IS6110. Una única copia de IS6110

es característica de las cepas de *M. bovis* aisladas de ganado vacuno. Además, en una gran proporción de cepas, ésta está situada en el mismo lugar del cromosoma, dificultando su diferenciación con este marcador genético; así, en los estudios publicados, el 97% de las cepas de *M. bovis* estudiadas en Nueva Zelanda, 105 de 109 cepas bovinas irlandesas, 31 de 51 cepas procedentes de Argentina y Holanda (31 de 32 si no se incluyen 19 cepas con seis copias, procedentes de un brote), y 16 de 17 cepas bovinas españolas poseen una única copia (Collins et ál, 1993; Skuce et ál, 1994; Van Soolingen et ál, 1994; Gutiérrez et ál, 1995). Estas cepas de *M. bovis* aisladas de ganado vacuno no pueden ser satisfactoriamente tipificadas mediante RFLP con IS6110. En este estudio, el método de spoligotyping clasificó apropiadamente las cepas de una copia situada en el fragmento *PvuII* de 1,9 K.b. en nueve grupos.

El spoligotipo más frecuentemente encontrado, el spb-7, apareció repartido por el país. Pudo ser diferenciado en nueve tipos con la sonda para IS6110 RHL, y en once si se consideran los resultados de las dos sondas dirigidas a esta secuencia de inserción, RHS y LHS. La utilización conjunta de los resultados de ambos métodos de tipificación obtuvo una diferenciación más completa que las ofrecidas por cada uno y utilizados independientemente. A la vista de estos resultados, sugerimos una caracterización inicial de todas las cepas mediante DVR-spoligotyping, seguida de una caracterización mediante RFLP con IS6110 de las cepas que pertenezcan a los spoligotipos más prevalentes.

Los resultados obtenidos mediante spoligotyping de las cepas caprinas de *M. bovis* concuerdan con los obtenidos mediante RFLP publicados recientemente (Gutiérrez et ál, 1995; Liébana, 1996). En ambos estudios, las cepas aisladas de cabras compartieron varias copias del elemento IS6110, sugiriendo que formaban un grupo especial de cepas de *M. bovis* similares, responsables de la tuberculosis caprina en España. Los patrones de las cepas caprinas de *M. bovis* obtenidos mediante spoligotyping también agruparon a estas cepas en un grupo muy homogéneo. La cepa ovina perteneció también a este grupo. Este hecho no es sorprendente ya que los rebaños mixtos caprino-ovino son una práctica común en algunas áreas del país. La variación entre las cepas de *M. bovis* de origen vacuno y caprino puede ser atribuída a una falta de transmisión entre ambos tipos de ganado o a una infección preferente

por un tipo particular de cepa, siendo necesario el estudio de cepas obtenidas de granjas donde se encuentren ambas especies animales.

El papel potencial de los animales salvajes en el mantenimiento de las infecciones de *M. bovis* en el ganado es especialmente importante en países donde los programas de erradicación han reducido sustancialmente la incidencia de la tuberculosis bovina, pero todavía continúan existiendo brotes esporádicos (Little et ál, 1982; Stumpff, 1982; Clifton-Hadley et ál, 1991; Nolan et ál, 1994). En algunas áreas de Nueva Zelanda se encontraron los mismos patrones con análisis de restricción enzimática en cepas procedentes de ciervos, possums y ganado vacuno (Collins et ál, 1988). En este país se determinó la existencia de un gran número de tipos de *M. bovis*, cada uno limitado a una pequeña área geográfica, en la que se mantienen infectando animales salvajes (Collins et ál, 1988). El spoligotyping identificó que las cepas aisladas de los ciervos y los jabalíes españoles compartían el mismo patrón que algunas cepas bovinas (spb-6, spb-7 y spb-15). Aunque no tenemos evidencia directa de la relación epidemiológica de los aislados, la transmisión entre las diferentes especies animales, o a través de una fuente común, parece probable.

El patrón obtenido de la cepa del primer gato fue bastante similar al obtenido con las cepas del ganado vacuno; una posible ruta de transmisión de la infección pudo haber sido la ingestión de comida infectada. Sin embargo, las medidas de control establecidas, tales como la pasteurización de la leche y la inspección de la carne son obligatorias en España. El patrón de spoligotyping encontrado en la cepa aislada del gato con lesiones en el tracto respiratorio fue bastante diferente al de las otras cepas.

Se han descrito varios brotes de *M. tuberculosis* multirresistentes asociados a transmisión nosocomial (DiPerri et ál, 1989; Beck-Sagué et ál, 1992; Brian et ál, 1992; Dooley et ál, 1992; Edlin et ál, 1992; Fischl et ál, 1992; Pearson et ál, 1992). La mayoría de ellos afectaron a personas infectadas con el HIV; en casi todos estos brotes, el personal sanitario encargado del cuidado de estos pacientes resultó también infectado, según se pudo detectar mediante la conversión de la intradermoreacción, por lo que es previsible el paso de estas cepas a la población general. España padece la mayor incidencia declarada de HIV

en Europa: 143,4 casos por millón de habitantes en 1994 (WHO-EC Collaborating Centres on AIDS, 1995). En la Comunidad Autónoma de Madrid, aunque la tuberculosis no es una enfermedad de declaración obligatoria, se registraron 42,06 casos cada 100.000 habitantes (Boletín Epidemiológico de la C.A.M., 1996). Además del brote de *M. bovis* multirresistente estudiado, ha existido en Madrid otro brote nosocomial de *M. tuberculosis* multirresistente a isoniazida y rifampicina (Rullán et ál, 1996). El spoligotipo de las cepas de *M. bovis* humanas se encuadró dentro del grupo de las cepas bovinas españolas estudiadas; sin embargo, aunque parece probable que derive de alguna cepa relacionada con este grupo por los rasgos peculiares presentados, no podemos afirmar que éste fuese su origen, ya que no coincidió plenamente con ninguno de los patrones de las cepas aisladas de los animales. Los patrones obtenidos mediante spoligotyping del ADN de las cepas humanas de *M. bovis*, de diferente procedencia geográfica y pertenecientes a la colección de cultivos del Australian Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis, mantuvieron las mismas características. Estos patrones pertenecieron asimismo al grupo de cepas bovinas, pero sin existir rasgos propios significativos que los clasificaran en un subgrupo. Aunque es necesario la tipificación de un mayor número de cepas, este hecho puede sugerir que de algún modo continua siendo el ganado vacuno la principal fuente de tuberculosis humana producida por *M. bovis*.

Mycobacterium bovis BCG proviene teóricamente de una fuente bovina, pero su comprobación es imposible, ya que el original se perdió antes de 1921. Sus características fenotípicas son más cercanas a *M. tuberculosis* que a *M. bovis*, por lo que algunos autores la consideran más próxima a *M. tuberculosis*, o una especie separada dentro del complejo *M. tuberculosis* (Grange et ál, 1983). El REA con las enzimas *BstEII*, *PvuII* y *BclI* confirma estas cepas como miembro de la especie *M. bovis* (Collins et ál, 1987). Además, coincidiendo con gran parte de las cepas bovinas, las cepas de *M. bovis* BCG tienen una única copia del elemento de inserción *IS6110* situada en un fragmento de 1,9 K.b. tras la restricción con *PvuII* (Hermans et ál, 1990). Es el ejemplo más sorprendente de la estabilidad de este elemento a pesar de la propagación independiente desde hace décadas de esta cepa vacunal. Solamente existen tres cepas que presentan un elemento adicional (Fomukong et ál, 1992; van Soolingen et ál, 1993). La diferenciación de *M. bovis* BCG de las cepas clínicas de *M. bovis* se basa en el patrón característico obtenido con RFLP asociado a la *IS1081*, que contiene un

fragmento de 8 Kb que no existe en ninguna otra especie del complejo (van Soolingen et ál, 1992). Corroborando la estabilidad genética de estas cepas, todas las cepas de *M. bovis* BCG caracterizadas en este estudio presentaron el mismo patrón, el spb-3; este spoligotipo se encontró también en cepas de *M. bovis* aisladas de algunas granjas de ganado vacuno. Al igual que otras cepas de *M. bovis*, carecieron de los espaciadores 39 a 43. Según este método de tipificación las cepas de *M. bovis* BCG estudiadas pertenecen claramente a la especie *M. bovis*.

Para evaluar la aptitud del spoligotyping para la determinación de subpoblaciones de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* asociadas a hospedadores, como podría suceder en el caso del ganado caprino, se utilizaron las cepas denominadas *seal bacillus* y *dassie bacillus*. Las *seal bacillus* son micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* que fueron aisladas de pinnípedos salvajes, de una colonia en cautividad y de su entrenador. La morfología de estos aislados es similar a la de *M. bovis*, y son muy virulentos para el conejo y el cobaya. Tienen un cordfactor débil, son glicerol-tolerantes y no presentan niveles detectables del antígeno MPB70 (Cousins et ál, 1990), cuya producción se considera específica de *M. bovis* (Harboe et ál, 1984; Radford et ál, 1988). Estos aislados contienen además la secuencia mtp40 (Liébana et ál, 1996) originalmente considerada específica de *M. tuberculosis* (del Portillo et ál, 1991).

El análisis de estas cepas mediante REA con *BstEII*, *BclII*, y *PvuII*, y RFLP asociado a los elementos IS6110 y PGRS reveló una fuente común de infección, y que eran diferentes de otros miembros del complejo tuberculosis (Cousins et ál, 1993). Nuestros resultados coinciden en la clasificación de estas cepas como un grupo genético particular muy estable dentro del complejo *M. tuberculosis*. En todas las cepas se obtuvo el mismo patrón, independientemente del origen geográfico y año de aislamiento, bastante diferente del obtenido de otras cepas de *M. bovis*. En el patrón no se observaron los espaciadores 39 a 43, por lo que no debe ser encuadrado dentro de la especie *M. tuberculosis*. El origen de esta infección es desconocido; no se encontró ningún spoligotipo semejante entre las cepas de *M. bovis* australianas de origen humano o animal investigados (datos no mostrados). Dada la falta de contacto con personas o animales infectados, es posible que la infección sea endémica en

esta población desde hace mucho tiempo. Nos gustaría destacar que aunque estas cepas parezcan asociadas a un determinado grupo de hospedadores, no significa que no puedan en determinadas ocasiones pasar a otros. El cuidador de la colonia de focas mantenidas en cautividad desarrolló tuberculosis pulmonar después de su trabajo en el parque marino. La cepa aislada de esta persona, con las características anteriormente descritas, mostró un spoligotipo idéntico al de las cepas aisladas de las focas con las que había trabajado.

Las cepas de *dassie bacillus*, consideradas miembros de la especie *Mycobacterium microti* comparten características morfológicas (aspecto curvo), de cultivo (dos tipos de colonia) y bioquímicas similares a las de *M. microti*, pero es mucho menos virulenta para cobayas, conejos y ratas, en los que produce lesiones similares pero benigna (Wagner et ál, 1958). En *dassies*, estas cepas originan una infección intensa y rápida, pero benigna; mientras que *M. microti* produce una enfermedad lenta y mortal (Wagner et ál, 1961). Con REA, utilizando las enzimas de restricción *BstEII* y *BcII*, *M. microti* es marcadamente diferente a las otras especies del complejo (Collins et ál, 1985). El análisis de estas cepas con el elemento IS6110 detectó 10 a 13 copias en *M. microti*, y 13 a 15 en la cepa de *dassie bacillus* aislada en Sudáfrica, y 10 en los dos aislados en Australia, existiendo entre estos últimos más relación (Cousins et ál, 1994). Los resultados obtenidos con la caracterización por spoligotyping clasificaron estos aislados en dos grupos; el primero incluye las cepas obtenidas de los *dassies*, en los que existe una relación del 90%; y un segundo grupo, formado por las cepas de *M. microti*. Entre ambos grupos la relación es inferior al 20%.

La existencia de estas subpoblaciones ha sido observada también en *M. tuberculosis*. Recientemente ha sido descrita una familia de cepas de *M. tuberculosis* en el sudeste asiático denominada tipo Beijing, con un patrón de spoligotyping característico, formado solamente por los espaciadores 35 a 43 (van Soolingen et ál, 1995). Para estos autores se trata de una familia de cepas altamente relacionada que probablemente deriven de un antecesor común, con mayor agresividad, aunque la naturaleza de los motivos que contribuyen a su diseminación son desconocidos (van Soolingen et ál, 1995). La relación de dos cepas pertenecientes a esta familia, con el resto de las cepas de *M. tuberculosis* caracterizadas (datos no mostrados), entre las que se incluyó la cepa de referencia H37Rv, fué inferior al 20%. La

uniformidad genética de las cepas de esta familia y su escasa relación con otras nos induce a pensar que este grupo tiene también características de subpoblación, aunque no podamos afirmar si está asociada a la localización geográfica o a una determinada población humana.

Una significativa ventaja del spoligotyping sobre el RFLP es su simplicidad y rapidez en la realización, y que requiere solamente una pequeña cantidad de ADN. La amplificación de los espaciadores mediante PCR puede también realizarse en suspensiones de colonias de micobacterias inactivadas por calor (datos no mostrados), evitando así la necesidad del subcultivo y la laboriosa extracción y purificación del ADN; y podría ser utilizado en ADN extraído directamente de las muestras clínicas. Para el análisis mediante RFLP se necesita más tiempo y el protocolo es más complicado. Ninguna sonda utilizada sola es lo suficientemente discriminatoria para permitir un estudio preciso de la epidemiología de la tuberculosis bovina, por lo que deben utilizarse en combinación o con otros métodos para verificar la relación (Crawford, 1993; Skuce et ál, 1994). En nuestro estudio, para obtener el mismo nivel de discriminación con las cepas de *M. bovis* fue necesario comparar los resultados de la hibridación con dos sondas para IS6110 (RHS y LHS), y para poder realizar el análisis de ordenador fue necesaria la hibridación con los marcadores internos de peso molecular conocido. Trabajando con el spoligotyping puede obtenerse un nivel de discriminación similar con solamente una hibridación. En cada test de spoligotyping pueden estudiarse 42 cepas, y los resultados son reproducibles, independientemente de la calidad de las muestras.

El análisis de los resultados es mucho más fácil que el utilizado para el RFLP, y tanto la metodología como el análisis pueden ser estandarizados para permitir la comparación de los spoligotipos entre diferentes laboratorios. Existe un consenso internacional sobre una metodología estandarizada para la tipificación de los microorganismos del complejo *M. tuberculosis* (van Embden et ál, 1993) que ha permitido la comparación internacional de cepas de *M. tuberculosis* y el establecimiento de una base de datos de patrones de tipificación con IS6110 que comprende 5.500 cepas. Esta base de datos permite el seguimiento de la transmisión de la tuberculosis a través de las fronteras (Hermans et ál, 1995; van Soolingen et ál, 1995). De forma similar, podría establecerse una base de datos de spoligotipos de *M. bovis*. Esta base de datos sería más fácil de manejar ya que se basaría solamente en la

presencia o ausencia de los 43 espaciadores. Podría realizarse como una definición de una palabra de 43 letras, utilizando un código de tres letras (a, presente, b, ausente, o c, indeterminado en caso de reacción débil). Así, la comparación entre laboratorios no dependería de sofisticados programas de ordenador como los necesarios para el análisis del RFLP (Hermans et ál, 1995).

En resumen, el DVR-spoligotyping es un método eficaz para la caracterización epidemiológica de las cepas de *M. bovis* aisladas de diversos orígenes. Con este método se identificaron dos grupos homogéneos de cepas de *M. bovis*. Nuestros resultados sugieren que es poco probable que las cabras actúen como reservorios de la tuberculosis bovina en España, aunque este hecho no pueda ser completamente descartado. Los spoligotipos hallados en las cepas aisladas de animales salvajes (ciervos y jabalíes) fueron también encontrados en el ganado vacuno, sugiriendo una transmisión entre ambos, y poniendo de manifiesto la necesidad de un estudio de la prevalencia y control de la infección en estos reservorios como herramienta importante en la erradicación de la tuberculosis.

CONCLUSIONES

Primera

La extracción del ADN de las micobacterias y su amplificación por PCR permiten la identificación rápida y sensible de microorganismos de los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium-intracellulare* a partir de muestras clínicas de diferentes especies animales, reduciendo el tiempo necesario para el diagnóstico a 2 ó 3 días. Esta técnica puede utilizarse también cuando las muestras están mal conservadas, en condiciones que implican una pérdida de viabilidad de las micobacterias o cuando existe sobrecrecimiento de otros microorganismos.

Segunda

Las etapas de descontaminación de la muestra con NaOH y SDS, y el tratamiento con proteinasa K son esenciales. La eliminación de restos tisulares con CTAB y el sistema Wizard Minipreps (Promega) reduce las sustancias inhibitoras.

Tercera

La amplificación del ADN extraído con iniciadores comprendidos en el gen que codifica el ARN 16S del género *Mycobacterium*, y la posterior secuenciación de este fragmento permiten la identificación de bacterias cuyo crecimiento e identificación por medios convencionales es difícil.

Cuarta

En los estudios de caracterización molecular con finalidad epidemiológica realizados hemos observado que:

- a) El análisis RAPD carece de la suficiente reproducibilidad para ser aplicado en la tipificación de grandes grupos de cepas del complejo *M. tuberculosis* o para permitir la comparación de resultados obtenidos en diferentes laboratorios.
- b) El DVR-spoligotyping es un método adecuado para la caracterización epidemiológica de cepas de *M. bovis*, especialmente de aquellas que contienen una única copia de IS6110.
- c) La información más completa de una cepa se obtiene mediante la caracterización inicial del ADN con DVR-spoligotyping, seguido de un RFLP complementario de las cepas que pertenezcan a los spoligotipos más prevalentes.

Quinta

La caracterización de cepas de *M. bovis* españolas mediante DVR-spoligotyping permitió subdividir las en dos grupos; el primero contiene las cepas aisladas de seres humanos, ganado vacuno, animales salvajes y gatos, y el segundo las cepas obtenidas de ganado caprino y ovino.

Sexta

Dentro de cada uno de estos grupos los patrones de los spoligotipos son similares, indicando infección con un grupo homogéneo de cepas o que la región de los espaciadores identificados por este método es muy estable.

Séptima

El DVR-spoligotyping permite diferenciar subpoblaciones o biovariedades de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* asociadas a infecciones en determinados hospedadores, tales como las micobacterias aisladas de las cabras, los pinnípedos y las aisladas de los dasyatis.

BIBLIOGRAFÍA

- Abed Y, Davin-Regli A, Bollet C, De Micco P. Efficient discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by 16S-23S spacer region-based random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:1418-1420.
- Abou-Zeid C, Smith I, Grange J, Steele J, Rook G. Subdivision of daughter strains of bacille Calmette-Guérin (BCG) according to secreted protein patterns. *J. Gen. Microbiol.* 1986; 132:3047-3053.
- Abou-Zeid C, Ratliff TL, Wilker HG, Harboe M, Bennedsen J, Rook GAW. Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 1988; 56:3046-3051.
- Acha PN, Szyfres B. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals (2 ed.) Pan American Health Organization, Washington D.C. (USA) 1987. Scientific Publication 503.
- Ackerman LS, Benbrook SC, Walton BC. *Mycobacterium tuberculosis* infection in a parrot (*Amazona farinosa*). *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1974; 109:388-390.
- Adams LB, Fukutomi Y, Krahenbuhl JL. Regulation of murine macrophage effector functions by lipoarabinomannan preparations from mycobacterial strains of varying virulence. *Infect. Immun.* 1993; 61:4173-4181.
- Adams LB, Mason CM, Kolls JK, Scollard D, Krahenbuhl JL, Nelson S. Exacerbation of acute and chronic murine tuberculosis by administration of a TNF receptor-bearing adenovirus. *J. Infect. Dis.* 1995;171:400-405.
- Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acid Res.* 1992; 20:5137-5142.
- Alcamo IE. Fundamentals of Microbiology (4 ed). The Benjamin/Cummings Publishing Company 1994:14-17.
- Allan GS, Wickham N. Mycobacterial granulomas in a cat diagnosed as leprosy. *Feline Pract.* 1976; 6:34-36.
- Anargyros P, Astill DSJ, Lim ISL. Comparison of improved BACTEC and Lowenstein-Jensen media for the culture of mycobacteria from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol* 1990; 28:1288-1291.
- Andersen UB., Yuan ZL, Hasløv K, Vergmann B, Bennedsen J. Interspecies reactivity of five monoclonal antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* as examined by immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 23:446-451.
- Andersen P, Askgaard D, Ljungqvist L, Bentzon MW, Heron I. T-Cell proliferative response to antigens secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 1991; 59:1558-1563.
- Andersen P, Ljungqvist L, Haslov K, Bentzon MW, Heron I. Proliferative response to seven affinity purified antigens in eight strains of inbred mice. *Int. J. Lepr.* 1991; 59:58-67.
- Anderson RJ. Structural peculiarities of acid-fast bacterial lipids. *Chem. Rev.* 1941; 29:225-243.
- Anderson WAB (Ed). Pathology. CV Mosby Co., St. Louis (USA). 1971:946-961 (vol II).
- Anderson WI, King JM. *Mycobacterium avium* infection in a pygmy goat. *Vet. Rec.* 1993; 133:502.
- Angus RD, Payeur JB, Elksen LA. Preliminary evaluation of an intradermal tuberculin test utilizing cell wall protein extracted from *Mycobacterium bovis*. *Proc. U.S. Anim. Hlth. Assoc.* 1989:630-639.
- Anon. Bovine tuberculosis in badgers. 3rd report Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. HMSO London 1979.
- Anon. BCG vaccination: what should Australia do? *Med. J. Austr.* 1980; 2:534-535.

Anon. Bad news from India(Leader). Lancet 1980; 1:73-74.

Anon. TB infection in Dutch alpacas. Animal Pharm. 1989; 175:12.

Aranaz A, Liébana E, Pickering X, et al. Use of polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculosis in cats and dogs. Vet. Rec. 1996; 138:276-280.

Armbruster C, Junker W, Vetter N, Jaksch G. Disseminated bacille Calmette-Guérin infection in an AIDS patient 30 years after BCG vaccination. J. Infect. Dis. 1990; 162:1216.

Armstrong JA, D'Arcy HP. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. J. Exp. Med. 1971; 134:713-740.

Armstrong JA, D'Arcy HP. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. J. Exp. Med. 1975; 142:1-16.

Armstrong JR. Eradication of tuberculosis from an extensively managed beef herd. Aust. Vet. J. 1981; 57:220-223.

Auer LA. Assessment of an enzyme linked immunosorbent assay for the detection of cattle infected with *Mycobacterium bovis*. Aust. Vet. J. 1987; 64:172-176.

Auer LA, Schleeauf SM. Antibodies to mycobacteria in cattle not infected with *Mycobacterium bovis*. Vet. Microbiol. 1988;18:61-61.

Aufauvre-Brown A, Cohen J, Holden DW. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers to distinguish isolates of *Aspergillus fumigatus*. J. Clin. Microbiol. 1992; 30:2991-2993.

Augustin A, Kubo RT, Sim GK. Resident pulmonary lymphocytes expressing the gamma/delta T-cell receptor. Nature 1989; 340:239-241.

Aung H, Averill LE, Toossi Z, Ellner JJ. Induction of TNF-alpha from human monocytes stimulated with native 30 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Res. 1993; 41:323.

Azuma I, Ajisaka M, Yamamura Y. Polysaccharides of *Mycobacterium bovis* Ushi 10, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium phlei*, and atypical *Mycobacterium* P1. Infect. Immun. 1970; 2:347-349.

Baess I, Weis-Bentzon M. Deoxyribonucleic acid hybridization between different species of mycobacteria. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B. 1978; 86:71-76.

Baess I. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of slowly-growing mycobacteria. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B. 1979; 87:221-226.

Baess I. Deoxyribonucleic acid relationships between different serovars of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. 1983;B 91:201-203.

Baess I. Determination and re-examination of genome sizes and base ratios on deoxyribonucleic acid from mycobacteria. Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B. 1984; 92:209-211.

Baird PN, Hall LMC, Coates ARM. Cloning and sequence analysis of the 10-kDa antigen gene of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Gen. Microbiol. 1989; 135:931-939.

Baldwin JH. Pulmonary bovine tuberculosis in an owner and in his dairy herd. Cornell Veterinarian 1968:80-87.

Barksdale L, Kim KS. *Mycobacterium*. Bacteriol. Rev. 1977; 41:217-232.

Barnes PF, Mistry SD, Cooper CL, Pirmez C, T.H. R, Modlin RL. Compartmentalization of a CD4+ T lymphocyte subpopulation in tuberculosis pleuritis. J. Immunol 1989; 142:1114-1119.

- Barnes PF, Modlin RL, Bikle DD, Adams JS. Transpleural gradient of 1,25-dihydroxyvitamin D in tuberculosis pleuritis. *J. Clin. Invest.* 1989; 83:1527-1532.
- Barnes PF, Bloch AB, Davidson PT, Snider DEJ. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 1991; 324:1644-1650.
- Barnes PF, Chatterjee D, Abrams JS, et al. Cytokine production induced by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan: relationship to chemical structure. *J. Immunol.* 1992; 149:541-547.
- Barnes PF, Grisso CL, Abrams JS, Wang E, Rea TH, R.L. M. Gamma-delta T lymphocytes in human tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 1992; 165:506-512.
- Barnes PF, Mehra V, Rivoire B. Immunoreactivity of a 10 kD antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 1992; 148:1835-1840.
- Barnes PF, Lu SZ, Abrams JS, Wang E, Yamamura M, Modlin RL. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect. Immun.* 1993; 61:3482-3489.
- Barnes PF, Abrams JS, Lu S, Sieling PA, Rea TH, Modlin RL. Patterns of cytokine production by *Mycobacterium*-reactive human T cell clones. *Infect. Immun.* 1993; 61:197-203.
- Barnes PF, Modlin RL, Ellner JJ. T-Cell responses and cytokines. En: *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. Bloom BR (Ed.). Am. Soc. Microbiol, Washington DC (USA) 1994:417-435.
- Barnes PF, Rom WN. Cytokine Production in Tuberculosis. En *Tuberculosis* (1 ed). Rom WN and Garay S (Eds.). Little, Brown and Co. 1996:291-303.
- Barrera L, De Kantor IN. Nontuberculous mycobacteria and *Mycobacterium bovis* as a cause of human disease in Argentina. *Trop. Geogr. Med.* 1987; 39:222-227.
- Barrie JD, Bruce LG. Human infections with bovine tuberculosis in the west of Scotland. *Scott. Med. J.* 1966; 11:436-439.
- Barrow PA. Aspects of the epidemiology of bovine tuberculosis in badgers and cattle. II. The development and use of a typing system for *Mycobacterium bovis*. *J. Hyg. Cambridge* 1981; 86:247-257.
- Barry T, Collieran G, Glennon M, Dunikan LK, Gannon F. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Meth. Appl.* 1991; 1:51-56.
- Barton MD, Hughes KL. *Corynebacterium equi*: a review. *Vet. Bull.* 1980; 50:65-80.
- Basak DK, Chatterjee A, Neogi MK, Samanta DP. *Indian J. Anim. Health* 1975; 14:135.
- Bates JH. Diagnosis of tuberculosis. *Chest* 1979; 76(suppl.):757-763.
- Bates JH, Stead WW. The history of tuberculosis as a global epidemic. *Med. Clin. North Amer.* 1993; 77:1205-1217.
- Báguena Cervellera MJ. La tuberculosis y su historia. Colección Histórica de Ciencias de la Salud. Fundación Uriach. 1992.
- Bäumler AJ, Heffron F. Microbial resistance to macrophage effector functions: strategies for evading microbicidal mechanisms and scavenging nutrients within mononuclear phagocytes. En *Virulence mechanisms of bacterial pathogens* (2 ed), Roth (Ed.). American Society for Microbiology, Washington D.C. (USA) 1995:115-131.
- Beatson NS, Hutton JB, de Lisle GW. Tuberculosis-test and slaughter. *Proc. N. Z. Vet. Assoc. Deer Br.* 1984; 1:18-27.

- Beatson NS. Tuberculosis in Red deer in New Zealand. En *Biology of deer production*, Fennessy PF, Drew KR (Eds.) Roy. Soc. N. Z. Bull., 22. Wellington (New Zeland) 1985:147-151.
- Beck-Sagué C, Dooley SW, Hutton MD, Otten J, Breeden A, Crawford JT, Pitchenik AE, Woodley C, Cauthen G, Jarvis WR. Hospital outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections. Factors in transmission to staff and HIV-infected and patients. *J. Amer. Med. Ass.* 1992; 268:1280-1286.
- Beige J, Lokies J, Schaberg T, et al. Clinical evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:90-95.
- Bell RC, Hoffman-Goetz L, Keir R. Monocyte factors modulate in vitro T-lymphocyte mitogenesis in protein malnutrition. *Clin. Exp. Immunol.* 1986; 63:194-202.
- Belli LB. Bovine tuberculosis in a white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Can. Vet. J.* 1962; 3:356-358.
- Bercovier H, Kafri O, Sela S. Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1986; 136:1136-1141.
- Bercovier H, Kafri O, Kornitzer D, Sela S. *FEMS Microbiol. Lett.* 57:125-128.
- Berg DE, Akopyants NS, Kersulyte D. Fingerprinting microbial genomes using the RAPD or AP-PCR method. *Methods Mol. Cell. Biol.* 1994; 5:13-24.
- Berggren SA. Field experiments with BCG vaccine in Malawi. *Brit. Vet. J.* 1981; 137:88-94.
- Bermúdez LEM, Young LS. Tumor necrosis factor, alone or in combination with IL-2, but not IFN-gamma, is associated with macrophage killing of *Mycobacterium avium* complex. *J. Immunol.* 1988; 140:3006-3013.
- Bermúdez LE, Young LS, Enkel H. Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human macrophages: roles of membrane receptors and serum proteins. *Infect. Immun.* 1991;59:1697-1702.
- Bermúdez LE, Wu M, Petrofsky M. Interleukin-6 antagonizers tumor necrosis factor-mediated mycobacteriostatic and mycobactericidal activities in macrophages. *Infect. Immun.* 1992; 60:4245-4552.
- Bernabé A, Gómez MA, Navarro JA, Gómez S, Sánchez J, Sidrach J, Menchén V. Pathological changes of spontaneous dual infection of tuberculosis and paratuberculosis in goats. *Small Rumin. Res.* 1991; 5:377-390.
- Bernabé A, Gómez MA, Navarro JA, Gómez S, Sánchez J, Sidrach J, Menchén V, Vera A, Sierra MA. Morphopathology of caprine tuberculosis. I. Pulmonary tuberculosis. Estudio morfológico de la tuberculosis caprina. I. Tuberculosis pulmonar. *An. Vet. Murcia* 1990-91; 6-7:9-20.
- Besra GS, Chatterjee D. Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*. En *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. Bloom BR (Ed.). American Society for Mycrobiology, Washington DC (USA) 1994:285-306.
- Beutler B, Cerami A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N. Engl. J. Med.* 1987;316:379-385.
- Biberstein EL, Zee YC. *Rev. Vet. Microbiol.* Blackwell Scientific Publications 1990:202-212.
- Billman-Jacobe H, Carrigan M, Cockram F, Corner LA, Gill IJ, Hill JF, Jessup T, Milner AR, Wood PR. A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Austr. Vet. J.* 1991; 69:25-28.
- Bingen E, Boissinot C, Desjardins P, Cave N, Brahimi N, Lambert-Zechovsky N, Denamura E, Blot P, Elion J. Arbitrarily primed polymerase chain reaction provides rapid differentiation of *Proteus mirabilis* isolates from a pediatric hospital. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:1055-1059.
- Blain DP. Tuberculosis in the dog, cat and bird. *Vet. Rec.* 1913; 25:677.

Blattner RJ. Generalized BCG infection. J. Pediatr. 1964; 65:311.

Bleem AM, Bridges V, R.L. C. Overview of the assessment of risk factors for *Mycobacterium bovis* in the United States. Animal Health Insight 1993 (USDA:APHIS:VS):10-21.

Bloch H. Studies on the virulence of tubercle bacilli. Isolation and biological properties of a constituent of virulent organisms. J. Exp. Med. 1950; 91:197-217.

Blood DC, Radostits OM. Veterinary Medicine (7 Ed). Baillière Tindall. The University Press. Oxford (UK) 1989:710-722.

Bloom BR. New approaches to vaccine development. Rev. Infect. Dis. 1989; 11:S460-S467.

Bloom BR. Back to a frightening future. Nature 1992; 358:538-539.

Bloom BR, Murray CJL. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. Science 1992; 257:1055-1062.

Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blücker H, Büttger EC. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. J. Clin. Microbiol 1990; 28:1751-1759.

Boever WJ, Thoen CO, Wallach JD. *Mycobacterium chelonae* in a Natterer manatee. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 1976; 169:927-929.

Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. J. Exp. Med. 1991; 174:1549-1555.

Boletín Epidemiológico de la C.A.M. Informe: Registro de casos de tuberculosis de la Comunidad de Madrid. Dirección General de Prevención y Promoción de la Salud. Consejería de Sanidad y Servicios Sociales. 1996; 4:3-11.

Bonicke R, Lisboa BP. Neuere chemische verfahren zum Nachweis der Niacinbildung der Tuberkelbakterien und ihre Bedeutung für die Typendifferenzierung. Tuberkulosearzt 1958;12:380-386.

Bono M, Jemmi T, Bernasconi C, Burki D, Telenti A, Bodmer T. Genotypic characterization of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains. Appl. Environ. Microbiol. 1995; 61:371-373.

Boom WH, Wallis RS, Chervenak KA. Human *Mycobacterium tuberculosis*-reactive CD4+ T-cell clones: heterogeneity in antigen recognition, cytokine production, and cytotoxicity for mononuclear phagocytes. Infect. Immun. 1991; 59:2737-2743.

Bornet JP. Le chat, révélateur précoce de la tuberculose humaine. Bull. L'Académie Vét. de France 1982; 55:391-394.

Bothamley GH, Beck JS, Schreuder GM, et al. Association of tuberculosis and *M. tuberculosis*-specific antibody levels with HLA. J. Infect. Dis. 1989; 159:549-555.

Bouvet E, Casalino E, Mendoza-Sassi G, Lariven S, Vallée E, Pernet M, Gottot S, Vachon F. A nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* among HIV infected patients. A case-control study. AIDS 1993; 7:1453-1460.

Bouvier G, Burgisser H, Schneider PA. Observations sur les maladies du gibier, des oiseaux et des poissons faites en 1955 et 1956. Schweiz Arch Tierheilkd 1957; 99:461-477.

Bouvier G. Transmission possible de la tuberculose et de la brucellose du gibier à l'homme et aux animaux domestiques et sauvages. Nuova Vet. 1960; 36:185-188.

Böttger EC, Teske A, Kirschner P, Bost S, Chang HR, Beer V, Hirschel B. Disseminated *Mycobacterium*

genavense infection in patients with AIDS. The Lancet 1992; 340:76-80.

Böttger EC, Hirschel B, Coyle MB. *Mycobacterium genavense*. sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 1993;43:841-843.

Bradley SG. Reassociation of deoxyribonucleic acid from selected mycobacteria that from *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium farcinica*. Amer. Rev. Respir. Dis. 1972; 106:122-124.

Braun MM, et al. J. Amer. Med. Assoc. 1989; 261:393.

Brennan PJ, Ballou CE. Biosynthesis of mannophosphoinositides by *Mycobacterium phley*. J. Biol. Chem. 1967; 242:3046-3056.

Brennan PJ, Goren MB. Structural studies on the type-specific antigens and lipids of the *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare-Mycobacterium scrofulaceum* serocomplex. *Mycobacterium intracellulare* serotype 9. J. Biol. Chem. 1979; 254:4205-4211.

Brian RE, Tokars JJ, Grieco MH. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. N. Engl. J. Med. 1992; 23:1514-1521.

Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, Levy-Frebault V, Nassif X, Hance AJ. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet 1989; ii:1069-1071.

Brooks BW, Robertson RH, Corner AH. Evaluation of the serological response of sheep in one flock to *Mycobacterium paratuberculosis* by crossed immunoelectrophoresis. Can. J. Vet. Res. 1988; 52:199-204.

Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD, Noller HF. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 1981; 148:107-127.

Brown J, McDaniel HT, Hornsby PS, Dreensen DW. Sensitivity to avian purified protein derivative in cattle from farms having a high prevalence of swine mycobacteriosis. Appl. Environ. Microbiol. 1981;41:552-554.

Brown JA, Cheeseman CL, Harris S. Studies on the spread of bovine tuberculosis from badgers to cattle. J. Zool. Lond. 1992; 227:694-696.

Brozna JP, Horan M, Radenacher JM, Pabst KM, Pabst MJ. Monocyte responses to sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*: inhibition of priming for enhanced release of superoxide associated with increased secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha and altered protein phosphorylation. Infect. Immun. 1991; 59:2542-2548.

Buchan GS, Griffin JFT. Tuberculosis in domesticated deer (*Cervus elaphus*): a large animal model for human tuberculosis. J. Comp. Path. 1990; 103:11-22.

Buchanan TM, Nomaguchi H, Anderson DC. Characterization of antibody-reactive epitopes on the 65-kilodalton protein of *Mycobacterium leprae*. Infect. Immun. 1987; 55:1000-1003.

Buck GE, O'Hara LC, Summersgill JT. Rapid, simple method for treating clinical specimens containing *Mycobacterium tuberculosis* to remove DNA for Polymerase Chain Reaction. J. Clin. Microbiol. 1992; 30:1331-1334.

Buddle BM, Aldwell FE, Pfeffer A, de Lisle GW, Corner LA. Experimental *Mycobacterium bovis* infection in cattle: effect of dose of *M. bovis* and pregnancy on immune responses and distribution of lesions. N. Z. Vet. J. 1994; 42:167-172.

Bulla A. Global review of tuberculosis morbidity and mortality in the world (1961-1971). World Health Statistics Report. 1977; 30:2-38.

Bush M, Montali RJ, Phillips LG, Holobaugh PA. Bovine tuberculosis in a Bactrian camel herd: clinical, therapeutic and pathologic findings. J. Zoo and Wildlife Med. 1990; 21:171-179.

- Butler WR, Jost KC, Kilburn JO. Identification on mycobacteria by high-performance liquid chromatography. *Journal of Clinical Microbiology* 1991;29:2468-2472.
- Caetano-Anollés G, Bassam BJ, Gresshoff PM. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* 1991; 9:553-557.
- Caetano-Anollés G, Bassam BJ, Gresshoff PM. Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. *Mol. Gen. Genet.* 1992; 235:157-165.
- Caffrey JP. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. *Vet. Microbiol.* 1994; 40:1-4.
- Caldwell M. *The Last Crusade: The War on Consumption*. Atheneum Press 1988:183.
- Calmette A, Negre L, Boquet A. Essais de vaccination du lapin et du cobaye contre l'infection tuberculeuse. *Ann. Inst. Pasteur* 1922; 36:625-631.
- Caneti G. Endogenous reactivation and exogenous reinfection. Their relative importance with regard to the development of non-primary tuberculosis. *Bull. Un. int. Tuberc.* 1972; 47:116-122.
- Caniatti M, Parodi M, Cammarata G, Scanziani E, Lacchini C, Rivieli su 42 casi di tubercolosi in carnivori domestici del settore di Milano. *La Clinica Veterinaria* 1987; 110:300-317.
- Carlin JM, Borden EC, Sondel PM, Byrne GI. Biologic response modifier-induced indoleamin 2,3 dioxygenase activity in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *J. Immunol.* 1987; 139:2414-2418.
- Carpenter JL, Myers AM, Conner MW, Schelling SH, Kennedy FA, Reimann KA. Tuberculosis in five Basset Hounds. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 1988; 192:1563-1568.
- Carter CE, Corrin KC, de Lisle GW, Kissling RC. Comparative cervical test in deer. *Proc. N.Z. Vet. Assoc. Deer Br.* 1985; 2:80-87.
- Carter CE, Corrin KC, de Lisle GW, Kissling RC. An evaluation of the comparative cervical test in deer. *Proc. N.Z. Vet. Assoc. Deer Br.* 1986; 3:65-70.
- Carter CE. *Surveillance* 1988;15:8.
- Castets M, Rist N, Boisvert H. La variété africaine du bacille tuberculeux humain. *Médecine d'Afrique Noire* 1969; 4:321-322.
- Centers for Disease Control. Disseminated *M. bovis* infection from BCG vaccination of a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 1986; 34:227-228
- CEE. Communauté Economique Européenne: Informations: Directive du Conseil, 26/6/1964. *J. Off. Commun. Europeen.* 1964; 64/432/CEE.
- Cetrángolo A. Tuberculosis humana provocada por *Mycobacterium bovis*. *Anat. Patol. Clin.* 1971; 30:84-88.
- Chan J, Fujiwara T, Brennan P. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86:2453.
- Chan J, Fan X, Hunter SW, Brennan PJ, Bloom BR. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect. Immun.* 1991; 59:1755-1761.
- Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med.* 1992; 175:1111-1122.
- Chaparas SD, Brown TM, Hyman IS. Antigenic relationships of various mycobacterial species with *Mycobacterium tuberculosis*. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1978; 117:1091-1097.

Chaparas SD. The immunology of mycobacterial infections. *Rev. Microbiol* 1982; 9:139-197.

Chatterjee D, Hunter SW, McNeil M, Brennan P. Lipoarabinomannan. Multiglycosylated from of the mycobacterial mannosylphosphatidyl-inositols. *J. Biol. Chem.* 1992; 267:6228-6233.

Chatterjee D, Lowell K, Rivoire B, McNeil MR, Brennan PJ. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. Capping with mannose residues in some strains. *J. Biol. Chem.* 1992; 267:6234-6239.

Chatterjee D, Roberts AD, Lowell K, Brennan PJ, Orme IM. Structural basis of capacity of lipoarabinomannan to induce secretion of tumor necrosis factor. *Infect. Immun.* 1992; 60:1249-1253.

Chávez PR, Guerra A. Causas de nuevos reactores a la tuberculina mamífera en un área libre de tuberculosis bovina. *Rvta. Cub. Cienc. Vet.* 1981; 12:107-112.

Chávez PR. Efectos de la interpretación del número de reacción en pruebas de tuberculina en el ganado bovino para considerar los animales positivos. *Rev. Cub. Cienc. Vet.* 1983; 14:195-200.

Cheeseman CL, Mallinson PJ. Behaviour of badgers (*Meles meles*) infected with bovine tuberculosis. *J. Zool.* 1981; 194:284-289.

Cheeseman CL, Wilesmith JW, Stuart FA, Mallinson PJ. Dynamics of tuberculosis in a naturally infected badger population. *Mammal Rev.* 1988; 18:61-72.

Cheville NF. Introduction to Veterinary Pathology. Iowa State University Press/AMES 1988:303-308.

Chillaud T. The role of the Office International des Epizooties in the control of animal tuberculosis. Proceedings of the International Conference on Animal Tuberculosis in Africa and the Middle East, 28-30 April 1992. Cairo: General Organization for Veterinary Services 1992:245-263.

Chiodini RJ. *Mycobacterium paratuberculosis*: an emerging pathogen? *Acta Leprol.* 1989;7:S16-S17.

Choquette LPE, Gallivan JF, Byrne JL, Pilipavicius J. Parasites and diseases of bison in Canada. 1. Tuberculosis and some other pathological conditions in bison at Wood Buffalo and Elk Island National Parks in the fall and winter of 1959-1960. *Can. Vet. J.* 1961; 2:168-174.

Clancey JK. The incidence of tuberculosis in lechwe (Marsh Antelope). *Tubercle* 1977; 58:151-156.

Clark AG, Lanigan CMS. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDS. *Mol. Biol. Evol.* 1993; 10:1096-1111.

Clark-Curtiss JE, Jacobs WR, Docherty MA, Ritchie LR, Curtiss III R. Molecular analysis of DNA and construction of genomic libraries of *Mycobacterium leprae*. *J. Bacteriol.* 1985; 161:1093-1102.

Clark-Curtiss JE. Genome structure of mycobacteria. En *Molecular Biology of the Mycobacteria*. McFadden JJ (Ed.). London University Press. London (UK) 1990:77-96.

Clarridge JE, Shawar RM, Shinnick TM, Plikaytis BB. Large-scale use of polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:2049-2056.

Claxton PD, Eamens GJ, Mylrea PJ. Laboratory diagnosis of bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal* 1979; 55:514-520.

Clercx C, Coignoul F, Jakovljevic S, Balligand M, Mainil J, Henroteaux M, Kaeckenbeck A. Tuberculosis in dogs: a case report and review of the literature. *J. Amer. Animal Hosp. Assoc* 1992; 28:207-211.

Clercx C, Jakovljevic S, Henroteaux M, de Groote A, Kaeckenbeck A, Coignoul F. Deux cas de tuberculose féline (*Mycobacterium bovis*). *Ann. Méd. Vét.* 1992; 136:141-145.

Clifton-Hadley RS, Wilesmith JW. Tuberculosis in deer: a review. *Vet. Rec.* 1991; 129:5-12.

Clifton-Hadley RS, Wilesmith JW, Stuart FA. *Mycobacterium bovis* in the European badger (*Meles meles*): epidemiological findings in tuberculous badgers from a naturally infected population. *Epidemiol. Infect.* 1993; 111:9-19.

Closs O, Harboe M, Axelsen H, Bunch-Christensen K, Magnusson M. The antigens of *Mycobacterium bovis* strain BCG studied by crossed immunoelectrophoresis: a reference system. *Scan. J. Immunol.* 1980; 12:249-264.

Coates ARM, Allen BW, Hewitt J, Ivanyi J. Antigenic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* detected by means of monoclonal antibodies. *The Lancet* 1981; 2:167-169.

Coates ARM, Allen RW, Hewitt J, Ivanyi J, Mitchison DA. Antigenic diversity of *Mycobacterium bovis* detected by means of monoclonal antibodies. *Lancet* 1981; 167:167-169.

Cohn DL, Catlin BJ. A 62-dose, 6-month therapy for pulmonary and extrapulmonary tuberculosis. A twice-weekly, directly observed and cost effective regimen. *Ann. Int. Med.* 1990; 112:407-415.

Cohn ML, Waggoner RF, McClatchy JK. The 7H11 medium for the cultivation of mycobacteria. *Amer. Rev. Respir. Dis.* 1968; 98:295-296.

Colditz GA, Brewer TF, Berkey KS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. *J. Amer. Med. Assoc.* 1994; 271:698-702.

Coleman JD. Distribution, prevalence, and epidemiology of bovine tuberculosis in brushtail possums, *Trichosurus vulpecula*, in the Hohunu Range, New Zealand. *Aust. Wildl. Res.* 1988; 15:651-663.

Coletsos PJ. Milieu et modalités de culture adaptés a la réanimation et à la multiplication in vitro de *M. tuberculosis* de vitalité réduite, de viabilité éphémère ou en état de quiescence. *Ann. Inst. Past.* 1960; 99:475-479.

Coletsos JP. Isolation des mycobactéries. *Reviste de Tuberculose et Pneumologie* 1971; 35:601-616.

Collins CH, Yates MD. A study of bovine strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from humans in south-east England, 1977-1979. *Tubercle* 1981; 62:113-116.

Collins CH, Yates MD, Grange JM. Subdivision of *Mycobacterium tuberculosis* into five variants for epidemiological purposes: methods and nomenclature. *J. Hyg.* 1982; 89:235-242.

Collins CH, Grange JM. The bovine tubercle bacillus. *J. Appl. Bacteriol.* 1983; 55:13-29.

Collins CH, Grange JM, Yates MD. A review - Mycobacteria in water. *J. Appl. Bacteriol.* 1984; 57:193-211.

Collins FM. Protection against mycobacterial disease by means of live vaccines tested in experimental animals. En *The mycobacteria: a source book*, Kubika GP, Wayne LG (Eds.), M. Dekker, Inc. New York (USA). 1984:787-840.

Collins DM, de Lisle GW. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the tuberculosis complex. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 21:562-564.

Collins P, McDiarmid A, Thomas LH, Matthews PRJ. Comparison of the pathogenicity of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium spp.* isolated from the wodd pigeon (*Columba palumbus* L.). *J. Comp. Pathol.* 1985; 95:591-597.

Collins FM. Protection afforded by BCG vaccines againts an aerogenic challenge by three mycobacteria of decreasing virulence. *Tubercle* 1985; 66:267-276.

Collins DM, de Lisle GW. BCG identification by DNA restriction fragment patterns. *J. Gen. Microbiol.* 1987; 133:1431-1434.

- Collins DM, Gabric DM, de Lisle GW. Typing of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle and other animals in the same locality. N. Z. Vet. J. 1988; 36:45-46.
- Collins DM, Stephens DM. Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. FEMS Microbiol. Lett. 1991; 83:11-16.
- Collins DM, Erasmuson SK, Stephens DM, Yates GF, de Lisle GW. DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110. J. Clin. Microbiol. 1993; 31:1143-1147.
- Collins DM, Radford AJ, de Lisle GW, Billman-Jacobe H. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biology approaches. Veterinary Microbiology 1994; 40:83-94.
- Collins DM, de Lisle GW, Collins JD, Costello E. DNA restriction fragment typing of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle and badgers in Ireland. Vet. Rec. 1994; 134:681-682.
- Collins FM. The immune response to mycobacterial infection: Development of new vaccines. Vet. Microbiol. 1994; 40:95-110.
- Cook M, Wobeser G, Lugton I. The comparative pathology of *Mycobacterium bovis* infection in possums and ferrets. Tuberculosis in wildlife and domestic animals, Otago Conference Series No.3 Griffin F, de Lisle G (Eds.) University of Otago Press, Dunedin, New Zealand 1995; 232-235.
- Cooke MM, Jackson R, Coleman JD. Tuberculosis in a free-living brown hare (*Lepus europaeus occidentalis*). N. Z. Vet. J. 1993; 41:144-146.
- Cordes DO, Bullians JA, Lake DE, Carter ME. Observations on tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in sheep. N. Z. Vet. J. 1981; 29:60-62.
- Corner LA, Pearson CW. Tuberculin sensitivity of cattle inoculated with atypical mycobacteria isolated from cattle, feral pigs and trough water. Aust. Vet. J. 1977; 53:67-71.
- Corner LA, Pearson CW. Response of cattle to inoculation with atypical mycobacteria of bovine origin. Aust. Vet. J. 1978; 54:379-382.
- Corner LA, Pearson CW. Pathogenicity for cattle of atypical mycobacteria isolated from feral pigs and cattle and the correlation of lesions with tuberculin sensitivity. Aust. Vet. J. 1978; 54:280-286.
- Corner LA, Pearson CW. Response of cattle to inoculation with atypical mycobacteria isolated from soil. Aust. Vet. J. 1979; 55:6-9.
- Corner LA, Barrett RH, Lepper AWD, Lewis V, Pearson CW. A survey of mycobacteriosis of feral pigs in the Northern Territory. Aust. Vet. J. 1981; 57:537-542.
- Corner LA. The duration of the response of cattle to inoculation with atypical mycobacteria. Aust. Vet. J. 1981; 57:216-219.
- Corner LA, John M, Bundesen PG, Wood PR. Identification of *Mycobacterium bovis* isolates using a monoclonal antibody. Vet. Microbiol. 1988; 18:191-196.
- Corner LA, Trajstman AC. An evaluation of 1-Hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. Vet. Microbiol. 1988; 18:127-134.
- Corner LA. Bovine Tuberculosis: standard necropsy and laboratory techniques. Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases. East Melbourne CSIRO, 1989.
- Corner LA, Melville L, McCubbin K, Small KJ, McCormick BS, Wood PR, Rothel JS. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. Aust. Vet. J. 1990; 67:389-392.

- Comer LA. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet. Microbiol. 1994; 40:53-63.
- Comer LA, Trajstman AC, Lund K. Determination of the optimum concentration of decontaminants for the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. N. Z. Vet. J. 1995; 43:129-133.
- Corrin KC, Carter CE, Kissling RC, de Lisle GW. Short interval intradermal skin testing in farmed red deer (*Cervus elaphus*) inoculated with *Mycobacterium bovis*. N. Z. Vet. J. 1987; 35:204-207.
- Cosivi O. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection in developing countries: Part I. Inf. Circ. WHO Mediterr. Zoon. Control Cent. 1995; 39:2-4.
- Cousins DV, Francis BR, Gow BL. Advantages of a new agar medium in the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. Vet. Microbiol. 1989; 20:89-95.
- Cousins DV, Francis BR, Gow BL, Collins DM, McGlasham CH, Gregory A, MacKenzie RM. Tuberculosis in captive seals: bacteriological studies on an isolate belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Res. Vet. Science 1990; 48:196-200.
- Cousins DV, Wilton SD, Francis BR. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. Vet. Microbiol. 1991; 27:187-195.
- Cousins DV, Wilton SD, Francis BR, Gow BL. Use of Polymerase Chain Reaction for the rapid diagnosis of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 1992; 30:255-258.
- Cousins DV, Williams SN, Reuter R, Forshaw D, Chadwick B, Coughran D, Collins P, Gales N. Tuberculosis in wild seals and characterisation of the seal bacillus. Aust. Vet. J. 1993; 70:92-97.
- Cousins DV, Francis BR, Casey R, Mayberry C. *Mycobacterium bovis* infection in a goat. Aust. Vet. J. 1993; 70:262-263.
- Cousins DV, Williams SN, Ross BC, Ellis TM. Use of a repetitive element isolated from *Mycobacterium tuberculosis* in hybridisation studies with *Mycobacterium bovis*: a new tool for epidemiological studies of bovine tuberculosis. Vet. Microbiol. 1993; 37:1-17.
- Cousins DV, Peet RL, Gaynor WT, Williams SW, Gow BL. Tuberculosis in imported hyrax (*Procavia capensis*) caused by an unusual variant belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Vet. Microbiol. 1994; 42:135-145.
- Crawford AB. Tuberculin sensitization in guinea pigs caused by various acid-fast organisms. J. Am. Vet. M. A. 1926; 69:579.
- Crawford AB. A sensitization method of differentiating avian from mammalian tubercle bacilli. Am. Rev. Tuberc. 1927; 15:111.
- Crawford J, Bates JH. Phage typing of mycobacteria. En The Mycobacteria: A sourcebook Wayne GP (Eds). Marcel Dekker Inc., New York (USA) 1984:123-132.
- Crawford JT. Applications of molecular methods to epidemiology of tuberculosis. Res. Microbiol 1993; 144:111-116.
- Crawford JT. Development of rapid techniques for identification of *M. avium* infections. Res. Microbiology 1994; 145:177-181.
- Crawford R. The King's Evil. Clarendon Press 1911.
- Crews KB. Post-mortem findings in bovine tuberculosis reactors. Surveillance 1991; 18:15-16.
- Crispin SM. Uveitis associated with systemic diseases in cats. Feline Practice 1987; 17:16-19.

Cromie RL, et al. Susceptibility of captive wildfowl to avian tuberculosis: the importance of genetic and environmental factors. *Tubercle* 1991; 72:105-109.

Crowle AJ. Evidence that vesicles containing living, virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in cultured human macrophages are not acidic. *Infect. Immunol.* 1991; 59:1823-1831.

Crowther RC, McCarthy CM. Guanine plus cytosine content of the *Mycobacterium avium* complex and other mycobacteria by high performance liquid chromatography analysis of deoxiribonucleotides. *Curr. Microbiol.* 1986; 13:307-311.

Cummings DM, Ristoph D, Camargo EE, Larson SM, Wagner HNJ. Radiometric detection of the metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Nucl. Med.* 1975; 16:1189-1191.

Cummins CS. Chemical composition and antigenic structure of cell walls of *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Actinomyces*, and *Arthrobacter*. *J. Gen. Microbiol.* 1962; 28:35-50.

Cutbill LT, Lyn A. Pulmonary tuberculosis of bovine origin. *Br. Med J.* 1944:283-285.

Czarniecki CW, Chiu HH, Wong GHW. Transforming growth factor beta modulates the expression of class II histocompatibility antigens on human cells. *J. Immunol.* 1988;140:4217-4223.

D'Andrea AD, Plotkin SA, Douglas SD, Polin RA. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 23:911.

D'Arcy HP. The value of tuberculin tests in man with special reference to the intracutaneous test. Medical Research Council Special Report Series 1932;164.

D'Arcy HP, Armstrong JA, Brown CA, Draper P. Ultrastructural study of the behaviour of macrophages toward parasitic mycobacteria. *Infect. Immun.* 1972; 5:803-807.

Daborn CJ, Grange JM. HIV/AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis. *Brit. Vet. J.* 1993; 149:405-417.

Daley CL, Small PM, Schecter GF, Schoolnik GK, McAdam RA, Jacobs WR, Hopewell PC. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. *N. Engl. J. Med.* 1992; 326:231-235.

Dalovisio JR, Stetter M, Mikota-Wells S. Rhinoceros' rhinorrhea: cause of an outbreak of infection due to airborne *Mycobacterium bovis* in zookeepers. *Clin. Infect. Dis.* 1992; 1515:598-600.

Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S. Multiple effects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 1993; 259:1739-1742.

Dams E, Hendriks L, Van de Peer Y. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research* 1988; 16:r87-r175.

Damsker B, Bottone EJ, Schneerson SS. Human infections with *Mycobacterium bovis*. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1974; 110:446-449.

Daniel TM, Janicki BW. Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry, and immunological properties. *Microbiol. Rev.* 1978; 42:84-113.

Daniel TM, Ellner JJ, Todd LS. Immunobiology and species distribution of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *Infect. Immun.* 1979; 24:77-82.

Daniel TM. The rapid diagnosis of tuberculosis: a selective review. *J. Lab. Clin. Med.* 1990; 116:277-282.

Dankner WM, Waecker NJ, Essey ME, Moser K, Thompson M, Davis CE. *Mycobacterium bovis* infection in San Diego: A clinicoepidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. *Medicine* 1993; 72:11-37.

- Dannenberg AM. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1982; 125:25-30.
- Dannenberg AMJ. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Rev. Infect. Dis.* 1989; 2 (supl 2):5369-5478.
- Dannenberg AM. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol. Today.* 1991; 12:228-233.
- Dannenberg A. Pathogenesis and immunology: basic facts. En *Tuberculosis* (3 ed). Schlossberg D (Ed.). Springer-Verlag, New York (USA) 1994:17-41.
- David HL. Response of mycobacteria to ultra violet light radiation. *Amer. Rev. Respir. Dis.* 1973; 108:1175-1185.
- David HL, Jahan MT, Jumin A, Grandry J, Lehman EH. Numerical taxonomy analysis of *Mycobacterium africanum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1978; 28:467-472.
- David HL, Lévy-Frébault V, Thorel MF. Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique. Commission des Laboratoires de Référence et d'Expertise de l'Institut Pasteur, Paris 1989.
- Davidson RM, Alley MR, Beatson NS. Tuberculosis in a flock of sheep. *N. Z. Vet. J.* 1981; 29:1-2.
- de Jong H, Ekdahl MO. Evaluation of a number of ancillary tuberculin tests in cattle. *N. Z. Vet. J.* 1969; 17:213-226.
- de Kantor IN, Bioch D, Roswurm JD. Mycobacteria isolated from nasal secretions of tuberculin test reactor cattle. *Amer. J. Vet. Res.* 1978; 44:1233-1234.
- de Kantor IN, de la Vega E, Bernadelli A. Infección por *Mycobacterium bovis* en liebres de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria* 1984; 65:268-270.
- de Kantor IN, Nader A, Bernadelli A, Girón DO, Man E. Tuberculosis infection in cattle not detected by slaughterhouse inspection. *J. Vet. Med.* 1987; 34:202-205.
- de Kantor IN, Ritacco V. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. *Vet. Microbiol.* 1994; 40:5-14.
- de Lisle GW, Samagh BS, Duncan JR. Bovine paratuberculosis. II. A comparison of fecal culture and the antibody response. *Can. J. Comp. Med.* 1980; 44:183-191.
- de Lisle GW, Corrin KC, Carter CE. Ancillary tests for detecting tuberculosis in farmed deer. *Proc. N. Z. Vet. Assoc. Deer Br.* 1984; 1:9-12.
- de Lisle GW, Havill PF. Mycobacteria isolated from deer in New Zealand from 1970-1983. *N. Z. Vet. J.* 1985; 33:138-140.
- de Lisle GW, Collins DM, Loveday AS, Young WA, Julian AF. A report of tuberculosis in cats in New Zealand, and the examination of strains of *Mycobacterium bovis* by DNA restriction endonuclease analysis. *N. Z. Vet. J.* 1990; 38:10-13.
- de Lisle GW, Crews K, de Zwart J. *Mycobacterium bovis* infection in wild ferrets. *N. Z. Vet. J.* 1993; 47:148-149.
- de Lisle GW, Collins DM. Surveillance 1993; 20:18.
- de Lisle GW. Mycobacterial infections in pigs. Surveillance 1994; 21:23-25.
- de Waal MR, Abrams J, Bennett B. Il-10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory

role of IL-10 produced by monocytes. J. Exp. Med 1991; 174:1209-1220.

de Waal MR, Haanen J, Spits H. Interleukin-10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down-regulation of class II major histocompatibility complex expression. J. Exp. Med. 1991; 174:915-924.

de Wit D, Steyn L, Shoemaker S, Sogin M. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. J. Clin. Microbiol. 1990; 28:2437-2441.

del Portillo P, Murillo LA, Patarryo ME. Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. J. Clin. Microbiol. 1991; 29:2163-2168.

Denis M. Interferon gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. Cell. Immunol 1991; 132:150-157.

Denner JC, Tsang AY, Chatterjee D, Brennen PJ. Comprehensive approach to identification of serovars of *Mycobacterium avium* serovars. J. Clin. Microbiol. 1992; 30:473-478.

Dewevre PJ, McAllister HA, Schirmer RG. *Mycobacterium fortuitum* infection in a cat. J. Amer. Hosp. Assoc. 1977; 13:68-70.

Dinareello C. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. N. Engl. J. Med. 1984; 311:1413-1418.

Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. J. Immunol. 1988; 141:2407-2412.

DiPerri G. Lancet 1989; II:1502.

Dodd K. Tuberculosis in free-living deer. Vet. Rec. 1984; 115:592-593.

Dolan LA. Badgers and bovine tuberculosis in Ireland: A review. En The badger, Proceedings of a seminar held on 6-7 March, 1991. Hayden TJ (Ed). Dublin: Royal Irish Academy 1993:9-22.

Dooley SW, Villarino ME, Lawrence M, et al. Nosocomial transmission of tuberculosis in a hospital unit for HIV-infected patients. J. Amer. Med. Assoc. 1992; 267:2632-2634.

Dorset M. A comparison of Kochs old tuberculin with a new synthetic medium tuberculin. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1934; 84:439-456.

Dowling LA, Schleeauf SM. Specific antibody response to *Mycobacterium bovis* in infected cattle analysed with six mycobacterial antigens in enzyme-linked immunosorbent assays. Res. Vet. Sci. 1991; 50:157-161.

Draper P, Rees RJW. Electron-transparent zone of mycobacteria may be a defence mechanism. Nature 1970; 228:860-861.

Draper P, Rees RJW. The nature of the electron-transparent zone that surrounds *Mycobacterium lepraemurium* inside host cells. J. Gen. Microbiol. 1973; 77:79-87.

Draper P. The anatomy of mycobacteria. En: The Biology of the Mycobacteria, Stanford C (Ed.). Academic Press, London (UK). 1982:9-52.

Drapier JC, Wietzerbin J, Hibbs JB. Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. Eur. J. Immunol. 1988; 18:1587-1592.

Drapier JC, Hibbs JB. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells.

J. Immunol. 1988; 18:2829-2838.

Drolet R. Disseminated tuberculosis caused by *Mycobacterium avium* in a cat. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 1986; 189:1336-1337.

Dubos JR, Middlebrook G. Media for the tubercle bacilli. Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis. 1947; 56:334-335.

Duffield BJ, Norton JH, Streeten TA. Application of the comparative cervical test to the identification of false positive reactions to the bovine tuberculin caudal fold test. Aust. Vet. J. 1985; 62:424-426.

Duffield BJ, Norton JH, Hoffman D. An analysis of recent isolations of *Mycobacterium bovis* and saprophytic mycobacteria from cattle in northern Queensland. Aust. Vet. J. 1989; 66:307-308.

Dungworth DL. En Pathology of Domestic Animals (3 ed), Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N (Eds.). Academic Press, Orlando (USA) 1985:493-505.

Dwyer B, Jackson K, Raios K, Sievers A, Wilshire E, Ross B. DNA restriction fragment analysis to define an extended cluster of tuberculosis in homeless men and their associates. J. Infect. Dis. 1993; 167:490-494.

Edlin BR, Tokars JJ, Grieco MH, Crawford JT, Williams J, Sordillo EM, Ong KR Kilburn JO, Dooley SW, Castro KG, Jarvis WR, Holmberg SD. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. New Engl. J. Med. 1992; 326:1514-1521.

Edwards PQ, Edwards LB. Story of the tuberculin test. Amer. Rev. Resp. Dis. 1960; 44 (supl):1-47.

Edwards D, Kirkpatrick CH. The immunology of mycobacterial diseases. Am. Rev. Respir. Dis. 1986; 134:1062-1071.

Edwards U, Rogall T, Blocker H, Emde M, Böttger EC. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucl. Ac. Res. 1989; 17:7843-7853.

Edwards KM, Voladri R, Menzies B, Kernodle DS. How safe is routine BCG immunization in HIV-infected children? Clin. Infect. Dis. 1994; 19:605, abstr. 252.

Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. J. Infect. Dis. 1990; 161:977-981.

Eisenach KD, Siford MD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using polymerase chain reaction. Amer. Rev. Respir. Dis. 1991; 144:1160-1163.

Ekdahl MO, Smith BL, Money DFL. Tuberculosis in some wild and feral animals in New Zealand. N. Z. Vet. J. 1970; 18:44-45.

El-Taweel A. Status of bovine tuberculosis in Egypt. Proceedings of the International Conference on Animal Tuberculosis in Africa and the Middle East, 28-30 April 1992. Moussa AAM, Lofti O, Mahir S (Eds). Cairo: General Organization for Veterinary Services. 1992:296-311.

Elian A, El-Affify A, Zaki OA. J. Egypt. Med. Assoc. 1953; 36:723.

Ellner JJ, Hinman AR, Dooley SW, et al. Tuberculosis symposium: emerging problems and promise. J. Infect. Dis. 1993; 168:537-551.

Ellsworth DL, Rittenhouse KD, Honeycutt RL. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. BioTechn. 1993; 14:214-217.

Elmossalami E, Ghawi A. Public health importance of camel's lung affection. Egypt. J. Vet. Science 1983; 18:109-119.

- Elwood DC, Waddington FG. A second experiment to challenge the resistance to tuberculosis in BCG vaccinated cattle in Malawi. *Brit. Vet. J.* 1972; 128:619-626.
- Emeri DL, Rothel JS, Wood PR. Influence of antigens and adjuvants on the production of gamma-interferon and antibody by ovine lymphocytes. *Immunol. Cell. Biol.* 1990; 68:127.
- Engers HD, participants aw. Results of a WHO sponsored workshop to characterize antigens recognized by mycobacteria-specific monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 1986; 51:718-720.
- Esparza I, Fox RI, Schreiber RD. Interferon-gamma-dependent modulation of C3b receptors (CR1) on human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 1986; 136:1360-1365.
- Espenik T, Figari IS, Shalaby MR. Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* 1987; 166:571-576.
- Essey MA, Payne RL, Himes EM, Luchsinger D. Bovine tuberculosis surveys of Axis deer and feral swine on the Hawaiian island of Molakai. *Proceedings of US Animal Health Association* 1981; 85:538-549.
- Essey MA, Koller MA. Status of bovine tuberculosis in North America. *Vet. Microbiol.* 1994; 40:15-22.
- Falcone V, Bassey EB, Toniolo A, Conaldi PG, Collins FM. Differential release of tumor necrosis factor-alpha from murine peritoneal macrophages stimulated with virulent and avirulent species of mycobacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1994; 8:225-232.
- Fanning A, Edwards S. *Mycobacterium bovis* infection in human beings in contact with elk (*Cervus elaphus*) in Alberta, Canada. *The Lancet* 1991; 338(Nov 16):1253-1255.
- Farhi DC, Mason UGI, Horsburgh CRJ. Pathologic findings in disseminated *Mycobacterium avium-intracellulare* infection. *Amer. J. Clin. Pathol* 1986; 85:67-72.
- Fauville-Dufaux M, Vanfleteren B, De Wit L, Vincke JP, Van Vooren JP, Yates MD, Serruys E, Content J. Rapid detection of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria by polymerase chain reaction amplification of a 162 bp DNA fragment from antigen 95. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1992; 11:797-803.
- Feldman WH, Moses HE, Karlson AG. *Corynebacterium equi* as a possible cause of tuberculosis-like lesions of swine. *Cornell Veterinarian* 1940;30:465-481.
- Fifis T, Plackett P, Corner LA, Wood PR. Purification of a major *Mycobacterium bovis* antigen for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Scand. J. Immunol* 1989; 29:91-101.
- Fifis T, Costopoulos C, Radord AJ, Bacic A, Wood PR. Purification and characterization of major antigens of *Mycobacterium bovis* culture filtrate. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 59:800-807.
- Fifis T, Costopoulos C, Corner LA, Wood PR. Serological reactivity to *Mycobacterium bovis* protein antigens in cattle. *Vet. Microbiol.* 1992; 30:343-354.
- Fifis T, Corner LA, Rothel JS, Wood PR. Cellular and humoral immune responses of cattle to purified *Mycobacterium bovis* antigens. *Scand. J. Immunol.* 1994; 39:267-274.
- Fifis T, Rothel JS, Wood PR. Soluble *Mycobacterium bovis* protein antigens: Studies on their purification and immunological evaluation. *Vet. Microbiol.* 1994; 40:65-81.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* 1991; 147:3815-3822.
- Firestein GS, Zvaifler NJ. Down regulation of human monocytes differentiation antigens by interferon gamma. *Clin. Immunol.* 1987; 104:343-354.

Fischl MA, Uttamchandani RB, Daikos GL. An outbreak of tuberculosis caused by multiple-drug resistant tubercle bacilli among patients with HIV infection. *Ann. Intern. Med.* 1992; 117:177-183.

Fleetwood AJ, Stuart FA, Bodé R, Sutton JP. *Vet. Rec.* 1988; 123:279.

Flesch I, Kaufmann SHE. Mycobacterial growth inhibition by gamma-interferon-activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 1987; 138:4408-4423.

Flesch I, Kaufmann SHE. Attempts to characterize the mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma-interferon activated bone marrow macrophages. *Infect. Immun.* 1988; 56:1464-1469.

Flesch IEA, Kaufmann SHE. Activation of tuberculo-static macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. *Infect. Immun.* 1990; 58:2675-2677.

Flesch IEA, Kaufmann SHE. Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma interferon-activated bone marrow macrophages: Roles of reactive nitrogen intermediates. *Infect. Immun.* 1991; 59:3213-3218.

Flesch IE, Hess JH, Oswald IP, Kaufman HE. Growth inhibition of *Mycobacterium bovis* by IFN-Gamma stimulated macrophages: regulation by endogenous tumor necrosis factor-alfa and by IL-10. *Int. Immunol.* 1994; 6:693-700.

Floyd MM, Silcox VA, Jones WDJ, Butler WR, Kilburn JO. Separation of *Mycobacterium bovis* BCG from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by using high-performance liquid chromatography of mycolic acids. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30:1327-1330.

Follows GA, Munk ME, Gatrill AJ, Coradt P, Kaufmann SHE. Gamma Interferon and interleukin 2, but not interleukin 4, are detectable in gamma/delta T-cell cultures after activation with bacteria. *Infect. Immun.* 1992; 60:1229-1231.

Fomukong NG, Dale JW, Osborn TW, Grange JM. Use of gene probes on the insertion sequence IS986 to differentiate between BCG vaccine strains. *J. Appl. Bacteriol.* 1992; 72:125-133.

Fomukong NG, Tang TH, Al-Maamary S, Ibrahim WA, Ramayah S, Yates M, Zainuddin ZF, Dale JW. Insertion sequence typing of *Mycobacterium tuberculosis*: characterization of a widespread subtype with a single copy of IS6110. *Tubercle and Lung Disease* 1994; 75:435-440.

Forbes BA, Hicks KES. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:1688-1694.

Forbes NA, Cromie RL, Brown MJ, Montali RJ, Bush M, Standford JL. Diagnosis of avian tuberculosis in waterfowl. *Proc. Assoc. Avian Vet.* 1993:182-186.

Forshaw D, Phelps GR. Tuberculosis in a captive colony of Pinnipeds. *J. Wildlife Dis.* 1991; 27:288-295.

Forster FH, Gerlach H. Mycobacteria in Psittaciformes. *Proc. Assoc. Avian Vet.* 1987:39-56.

Forster F, Gerlach H, Kösters J. Mykobakterien bei Papageien und Sittichen (Psittaciformes). *Deutsche Tierärztl. Wochenschr* 1988; 95:338-342.

Foster ES, Scavelli TD, Greenlee PG, Gilberston SR. Cutaneous lesion caused by *Mycobacterium tuberculosis* in a dog. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 1986; 188:1188-1189.

Foster CRW. The feasibility of developing an effective vaccine to protect cattle against bovine tuberculosis. Edinburgh (UK). University of Edinburgh 1992.

Fox JL. Coalition reacts to surge of drug-resistans TB. *ASM News* 1992; 58:135-139.

- Francis J. Bovine Tuberculosis, including a contrast with human tuberculosis. Staples Press, London (UK). 1947.
- Francis J. Tuberculosis in animals and man. Cassell, London (UK) 1958: 357.
- Francis J, Choi CL, Frost AJ. The diagnosis of tuberculosis in cattle with special reference to bovine PPD tuberculin. Aust. Vet. J. 1973; 49:246-251.
- Francis J, Seiler RJ, Wilkie IW, O'Boyle D, Lumsden MJ, Frost AJ. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD tuberculin. Vet. Rec. 1978; 103:420-435.
- Friend SCE, Russell EG, Hartley WJ. Infection of a dog with *Mycobacterium avium* serotype II. Vet. Pathol 1979; 16:381-384.
- Friendland JS, Remick DG, Shattock R, Griffin GE. Secretion of interleukin-8 following phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocyte cell lines. Eur. J. Immunol. 1992; 22:1373-1378.
- Froman S, Will DW, Bogen E. Bacteriophage active against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. I. Isolation and activity. Amer. J. Public Health 1954; 44:1326-1333.
- Frothingham R, Hills HG, Wilson KH. Extensive DNA sequence conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J. Clin. Microbiol. 1994; 32:1639-1643.
- Frothingham R. Differentiation of strains in *Mycobacterium Tuberculosis* complex by DNA sequence polymorphisms, including rapid identification of *M. bovis*. J. Clin. Microbiol. 1995; 33:840-844.
- Fry KL, Meissner PS, Falkinham JO. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. VI. Identification and use of epidemiological markers for studies of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium scrofulaceum*. Am. Rev. Respir. Dis. 1986; 134:39-43.
- Gardner IA, Hird DW. Environmental source of mycobacteriosis in a california swine herd. Can. J. Vet. Res. 1989; 53:33-37.
- Gajewski TF, Pinna M, Wong T. Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations. J. Immunol. 1991; 146:1750-1758.
- Gallagher J, Macadam I, Sayer J, van Lavieren LP. Pulmonary tuberculosis in free-living lechwe antelope in Zambia. Trop. Animal Health Prod. 1972; 4:204-213.
- Gallagher J, Horwill DM. A selective oleic acid albumin agar medium for the cultivation of *Mycobacterium bovis*. J. Hyg 1977; 79:155-160.
- Gallagher J. Badgers, cattle and tuberculosis. Lord Zuckerman report. HMSO, London 1980:86-94.
- Garcia-del Portillo F, Finlay BB. The varied lifestyles of intracellular pathogens within eukaryotic vacuolar compartments. Trends Microbiol. 1995; 3:373-380.
- Gately MK, Wolitzky AG, Quinn PM. Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. Cell. Immunol. 1992; 143:127-142.
- Genewein A, Telenti A, Bernasconi C, et al. Molecular approaches to identifying route of transmission of tuberculosis in the community. The Lancet 1993; 342:841-844.
- Georghiou P, Patel AM, Konstantinos A. *Mycobacterium bovis* as an occupational hazard in abattoir workers. Austr. N. Z. J. Med. 1989; 19:409-410.
- Gerlach H. Bacteria. En Avian medicine. Principles and practice. Ritchie BW, Harrison GJ and Harrison LH (Eds). Wingers Publishing, Lake Worth, Florida (USA) 1994:949-996.

- Gervois M. Fréquence de l'infection humaine par le bacille bovin: statistiques mondiales. *Poumon Coeur* 1966; 22:1145-1148.
- Ghorbel A, Amara A. Un cas de tuberculose canine. *Revue Médecine Vétérinaire* 1989; 140:277-279.
- Gill JW, Jackson R. Tuberculosis in a rabbit: a case revised. *N. Z. Vet. J.* 1993; 41:147.
- Glennon M, Smith T, Cormican M, Noone D, Barry T, Maher M, Dawson M, Gilnartin JJ, Gannon F. The ribosomal intergenic spacer region: a target for the PCR based diagnosis of tuberculosis. *Tubercle and Lung Disease* 1994; 75:353-360.
- Glickman SE, Butler WR, Kilburn JO, et al. Rapid identification of mycolic acid patterns of mycobacteria by high-performance liquid chromatography using pattern recognition software and a *Mycobacterium* library. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32:740-745.
- Gómez-Lus P, Fields BS, Benson RF, Martin WT, O'Connor SP, Black CM. Comparison of arbitrarily primed polymerase chain reaction, ribotyping and monoclonal antibody analysis for subtyping *Legionella pneumophila* serogroup-I. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:1799-1803.
- González JA, Veitia F, Remón S, Delgado L. Micobacterias aisladas de bovinos que reaccionaron a las pruebas tuberculínicas. *Rev. Cub. Cienc. Vet.* 1983; 14:173-176.
- Good RC, Beam RC. Seroagglutination. En *The mycobacteria: a sourcebook*. Kubica GP, Wayne LG (Eds). Marcel Dekker Inc., New York (USA). 1984:105-122.
- Good RC. Opportunistic pathogens in the genus *Mycobacterium*. *Annu. Rev. Microbiol.* 1985; 39:347-369.
- Goodfellow M, Wayne LG. Taxonomy and nomenclature. En *The Biology of the Mycobacteria*. Ratledge and Stanford (Eds). Academic Press, 1982.
- Goodfellow M, Minnikin DE. Circumscription of the genus, En *The mycobacteria. A sourcebook*. Kubica GP, Wayne LG (Eds). Marcel Dekker Inc. New York (USA). 1984:1-24.
- Gordon AH, D'Arcy HP, Young MR. Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature* 1980; 286:79-80.
- Goren MB, Hart PD, Young MR, Armstrong JA. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1976; 73:2510-2514.
- Goren MB, Brokl O, Roller P, Fales HM, Das BC. Sulfatides of *M. tuberculosis*: the structure of the principle sulfatide (SL-1). *Biochem.* 1976; 15:2728-2734.
- Goren MB, Brennan PJ. Mycobacterial lipids: chemistry and biologic activities. En *Tuberculosis*. Youmans GP (Ed). The W.B. Saunders Co. Philadelphia (USA) 1979:69-193.
- Goren MB. Immunoreactive substances of mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1982; 125:50-69.
- Goren MB, Grange JM, Aber VR, Allen BW, Mitchinson DA. Role of lipid content and hydrogen peroxide susceptibility in determinig the guinea-pig virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Br. J. Exp. Pathol.* 1982; 63:693-700.
- Goren MB. Polyanionic agents do not inhibit phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 1987; 41:122-129.
- Goret P, Toma B. Enquête épidémiologique sur la tuberculose du chien et du chat dans la région parisienne. *Animal de compagnie* 1971; 22:177-184.

Gorman NT, Halliwell REW. Mechanisms of immunological injury in hypersensitivity reactions. En Veterinary Clinical Immunology. Halliwell REW, Gorman NT (Eds). Saunders Company, London (UK) 1989; 212-231.

Goto M, Oka S, Okuzumi K, Kimura S, Shimada K. Evaluation of acridinium-ester-labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex in culture. J. Clin. Microbiol. 1991; 29:2473-2476.

Göbel UB, Geiser A, Stanbridge EJ. Oligonucleotide probes complementary to variable regions of ribosomal RNA discriminate between *Mycoplasma* species. J. Gen. Microbiol. 1987; 133:1969-1974.

Grange J, Aber M, Allen VR, Mitchison DA, Mikhail JR, McSwiggan DA, Collins CH. Comparison of strains of *Mycobacterium tuberculosis* from British, Ugandan and Asian immigrant patients: a study in bacteriophage typing, susceptibility to hydrogen peroxid and sensitivity to thiophene-2-carboxylic acid hydrazine. Tubercle 1977; 58:207-215.

Grange JM, Aber M, Allen VR, Mitchison BW, Goren DA, Goren MB. The correlation of bacteriophage types of *Mycobacterium tuberculosis* with guinea-pig virulence and in vitro-indicators of virulence. J. Gen. Microbiol. 1978; 108:1-7.

Grange JM, Gibson J, Osborne TW, C.H. C, Yates MD. What is BCG? Tubercle 1983; 64:129-139.

Grange JM. The humoral immune response in tuberculosis: its nature, biological role and diagnostic usefulness. Adv. Tuberc. Res. 1984; 21:1-78.

Grange JM. Environmental mycobacteria and BCG vaccination. Tubercle 1986; 67:1-4.

Grange JM, Yates MD. Infections caused by the opportunistic mycobacteria: a review. J. Royal Soc. Med. 1986; 79:226-229.

Grange JM, Yates MD. Incidence and nature of human tuberculosis due to *Mycobacterium africanum* in South-East England: 1977-1987. Epidemiol. Infect. 1989; 103:127-132.

Grange JM. Mycobacterial disease in the world: yesterday, today and tomorrow. En The Biology of the Mycobacteria. Ratledge C, Stanford J, Grange JM (Eds). Academic Press 1989; 3-36.

Grange JM, Collins JD, O'Reilly LM, Costello E, Yates MD. Identification and characteristics of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle, badgers and deer in the Republic of Ireland. Irish Vet. J. 1990; 43:33-35.

Grange JM, Yates MD, Boughton E. The avian tubercle bacillus and its relatives. J. Appl. Bacteriol. 1990; 68:411-431.

Grange JM, Yates DY. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. Vet. Microbiol. 1994; 40:137-151.

Green HH, Weybridge P.P.D. Tuberculin. Vet. J. 1946; 102:267.

Green EP, Tizard MLV, Moss MT. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. Nucleic Acids Res. 1989; 17:9063-9073.

Greenbaum LA, Horowitz JB, Woods A. Autocrine growth of CD4+ T cells. Differential effects of IL-1 on helper and inflammatory T cells. J. Immunol 1988; 140:1555-1560.

Greenberg PD, Lax KG, Schechter CB. Amer. Rev. Resp. Dis. 1991; 143:490.

Greene CE. Clinical Microbiology and Infections. Diseases of the Dog and Cat. W.B. Saunders Company. Philadelphia (USA) 1984:633-645.

Griffin JFT, Cross JP. In vitro test for tuberculosis in farmed deer. Proc. N.Z. Vet. Assoc. Deer Br. 1986; 3:71-77.

Griffin JFT, Cross JP. Cellular immunity in the aetiology and diagnosis of tuberculosis in deer. Proc. N.Z. Vet. Assoc. Deer Br. 1987; 4:137-147.

Griffin JFT. Stress and Disease in Farmed Deer. Publication of the Veterinary Deer Society 1987; 2:3.

Griffin FT. The aetiology of tuberculosis and mycobacterial diseases in farmed deer. Irish Vet. J. 1988; 42:23-26.

Griffin JFT, Cross JP. Diagnosis of tuberculosis in New Zealand farmed deer: an evaluation of intradermal skin testing and laboratory techniques. Irish Vet. J. 1989; 42:101-107.

Griffin JFT. Stress and immunity: a unifying concept. Vet. Immunol. Immunopathol. 1989; 20:263-312.

Griffin JFT, Nagai S, Buchan GS. Tuberculosis in domesticated red deer: comparison of purified protein derivative and the specific protein MPB70 for in vitro diagnosis. Res. Vet. Science 1991; 50:279-285.

Griffin JF. Diagnosis of Tb by blood testing: The Deer Research Laboratory, Dunedin North, New Zealand, 1992.

Griffin JFT, Cross JP, Buchan GS. Laboratory assays for the diagnosis in farmed red deer. En The biology of deer, Brown RD (Ed). Spring-Verlag, New York (USA). 1992:130-135.

Griffin JFT, Cross JP, Chinn DN, Rodgers CR, Buchan GS. Diagnosis of tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in New Zealand red deer (*Cervus elaphus*) using a composite blood test and antibody assays. N. Z. Vet. J. 1994; 42:173-179.

Griffin JFT, Buchan GS. Aetiology, pathogenesis and diagnosis of *Mycobacterium bovis* in deer. Vet. Microbiol. 1994; 40:193-205.

Griffith AS. Human tubercle bacilli in the milk of a vaccinated cow. J. Pathol. Bacteriol. 1913; 17:323-328.

Griffith AS. Further investigations of the type of tubercle bacilli occurring in the sputum of phthisical persons. Brit. Med. J. 1914; 1:1171-75.

Griffith AS. Bacillus tuberculosis. En A system of bacteriology in relation to medicine. Vol V. London (UK): HMSO 1930:191-199.

Griffith AS. Bovine tuberculosis in man. Tubercle 1937; 18:528-43.

Griffiths LM. Experiences with skin test in the field. Proc. Vet. Deer Soc 1989; 3:19-29.

Grimont F, Grimont PAD. Ribosomal nucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Ann. Inst. Pasteur 1986; 137B:165-175.

Grneck MD. Les maladies à l'aube de la civilisation occidentale. Parfs, Payot 1983.

Groenen PMA, Bunschoten AE, van Sooligen D, van Embden JDA. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application of strain differentiation by a novel typing method. Mol. Microbiol. 1993; 10:1057-1065.

Gross TL, Connelly MR. Nontuberculous mycobacterial skin infections in two dogs. Vet. Pathol. 1983; 20:117-119.

Grosskinsky CM, Jacobs WR, Clark-Curtiss JE, Bloom BR. Infect. Immun. 1989; 57:1535-1541.

Grossman A. Mycobacterial hepatitis associated with long-term steroid therapy. Feline Pract 1983; 13:37-41.

Guatelli JC, Gingeras TR, Richman DD. Nucleic acid amplification in vitro: Detection of sequences with low copy numbers and application to diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection. Clin. Microbiol. Rev. 1989; 2:217-226.

- Guelfi JF, Florio F, Queinnec G. Carrying out a lymphoblastic transformation test for cat's tuberculosis diagnosis. *Rev. Med. Vet.* 1977; 128:1493-1503.
- Guilbride PDL, Rollinson DHL, McNulty EG, Alley JG, Wells EA. Tuberculosis in the free living African (Cape) buffalo (*Syncerus caffer caffer* Sparrman). *J. Comparat. Pathol.* 1963; 73:337-348.
- Gunning RF. Bovine tuberculosis in roe deer. *Vet. Rec.* 1985; 116:300-301.
- Gutiérrez M, Samper S, Gavigan JA, Garcia JF, Martín C. Differentiation by molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains causing tuberculosis in cattle and goats. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:2953-2956.
- Gutter AE, Wells SK, Spraker TR. Generalized mycobacteriosis in a California sea lion (*Zalophus californicus*). *J. Zoo Animal Med.* 1987; 18:118-120.
- Habib NI, Warring FCJ. A fatal case of infection due to *Mycobacterium bovis*. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1966; 93:804-810.
- Hadwen S. J. *Amer. Vet. Med. Assoc.* 1942; 100:19.
- Hagan WA, Zeissig A. Johnin versus avian tuberculin as a diagnostic agent for paratuberculosis (Johne's disease) of cattle. *J. Am. Vet. M. A.* 1929; 74:985.
- Hagan WA. The no-lesion case problem in the tuberculosis eradication campaign. *Cornell Vet.* 1931; 21:163.
- Hanna J, Neill SD, O'Brien JJ. Use of PPD and phosphatide antigens in an ELISA to detect the serological response in experimental bovine tuberculosis. *Res. Vet. Science* 1989; 47:43-47.
- Hanna J, Neill SD, O'Brien JJ. ELISA tests for antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 1992; 31:243-249.
- Harboe M, Mshana RN, Closs O, Kronvall G, Axelsen NH. Cross-reaction between mycobacteria. II. Crossed immunoelectrophoretic analysis of soluble antigens of BCG and comparison with other mycobacteria. *Scand. J. Immunol.* 1979; 9:115-124.
- Harboe M, Nagai S. MPB70, a unique antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1984; 129:444-452.
- Harboe M, Nagai S, Patarroyo ME, Torres ML, Ramirez C, Cruz N. Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 1986; 52:293-302.
- Harboe M, Wiker HG, Duncan JR. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28:913-921.
- Harland PSEG, Brown RE. Tuberculin sensitivity following BCG vaccination in undernourished children. *East Afr. Med. J.* 1965; 42:233-238.
- Harrington BJ. A numerical taxonomic study of some corynebacteria and related organisms. *J. Gen. Microbiol.* 1966; 45:31-40.
- Harrington R, Karlson AG. Differentiation between *M. tuberculosis* and *M. bovis* by in vitro procedures. *Amer. J. Vet. Res.* 1966; 27:1193-1196.
- Haslov K, Andersen AB, Bentzon MW. Biological activity in sensitized guinea pigs of MPB70, a protein specific for some strains of *Mycobacterium bovis* BCG. *Scand. J. Immunol.* 1987; 26:445-454.
- Hastings EG, Beach BA, Thompson I. The sensitization of cattle to tuberculin by other than tubercle bacilli. *Amer. Rev. Tuberc.* 1930; 22:218.

- Hastings EG, Wisnicky W, Beach BA, McCarter J. A detailed study of no-lesion, tuberculin-reacting cattle. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 1933; 82:565.
- Havlr DV, Wallis RS, Boom WH, Daniel TM, Chervenak K, Ellner JJ. Human immune response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Infect. Immunol.* 1991; 59:665-670.
- Hawden S. Tuberculosis in the buffalo. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 1942; 100:19-22.
- Hawthorne VM, Jarret WFH, Lauder I, Martin WB, Roberts JBS. Tuberculosis in man, dog and cat. *Brit. Med. J.* 1957; 5046:675-678.
- Hedvall E. Bovine tuberculosis in man. A clinical study of bovine tuberculosis, especially pulmonary tuberculosis in the southernmost part of Sweden. *Acta Med. Scand.* 1942; 135:1-196.
- Hein WR, Tomasovic AA. An abattoir survey of tuberculosis in feral buffaloes. *Aust. Vet. J.* 1981; 57:543-547.
- Hermans PWM, van Soolingen D, Dale JW, Schuitema ARJ, McAdam RA, Catty D, van Embden JDA. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for the diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28:2051-2058.
- Hermans PWM, Schuitema ARJ, van Soolingen D, Verstynen CPHJ, Bik EM, Thole JER, Kolk AHJ, van Embden JDA. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28:1204-1213.
- Hermans PWM, van Soolingen D, Bik EM, de Haas PEW, Dale JW, van Embden JDA. The insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect. Immun.* 1991; 59:2695-2705.
- Hermans PWM, van Soolingen D, van Embden JDA. Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium goodii*. *J. Bacteriol.* 1992; 174:4157-4165.
- Hermans PWM, Messadi F, Guebresabher H, van Soolingen D, de Haas PEW, Heersma H, de Neeling N, Ayoub A, Portaels F, Frommel D, Zribi M, van Embden JDA. Usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *J. Infect. Dis.* 1995; 171:1504-1513.
- Hewson PI, Simpson WJ. Tuberculosis infection in cattle and badgers in an area of Staffordshire. *Vet. Rec.* 1987; 120:252-256.
- Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988; 187:87-94.
- Higgins DA, Gatrill AJ. A comparison of the antibody responses of badgers (*Meles meles*) and rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) to some common antigens. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1984; 75:219-226.
- Hillerdal G, Kallenius G, Hoffner S. A man caused a miniepidemic of animal tuberculosis-he infected his wife and cat. *Lakartidningen* 1981; 88:1216-1217.
- Hinshaw HC. Diseases of the chest, (3 ed). Saunders WB, Philadelphia (USA). 1969:501-502.
- Hinshaw WR. Tuberculosis of human origin in the Amazon parrot. *Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.* 1933; 28:273-278.
- Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol. Today* 1990; 11:443-449.
- Hird DW, Lamb CA, Lewis RV, Utterbank WW. Isolation of mycobacteria from California slaughter swine. *Proceedings 87th Annual Meeting U.S. Animal Health Assoc.* 1983:559-563.

- Hirschel B, Chang HR, Mach N, et al. Fatal infection with a novel unidentified mycobacterium in a man with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1990; 323:109-113.
- Hirsh CS, Ellner JJ, Russell DG, Rich EA. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor- α -mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. *J. Immunol.* 1994;152:743-753.
- Hix JW, Jones TC, Karison AG. Avian tubercle bacillus infection in the cat. *Amer. Vet. Med. Assoc.* 1961; 138:641-647.
- Ho JL, He SH, Rios MJC. Interleukin-4 inhibits human macrophage activation by tumor necrosis factor, and interleukin-3 for antileishmanial activity and oxidative burst capacity. *J. Infect. Dis* 1992; 165:344-351.
- Hoop RK, Bottger EC, Ossent P, Salfinger M. Mycobacteriosis due to *Mycobacterium genavense* in six pet birds. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:990-993.
- Hoop RK, Böttger EC, Pfyffer GE. Etiological agents of mycobacterioses in pet birds between 1986 and 1995. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34:991-992.
- Horsburgh CR. *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1991; 324:1332-1338.
- Hoyle FP. Suppression of tuberculin skin reactivity in cattle: a case report. *Surveillance* 1990;17:28.
- Huchzermayer H. Report of IUATLD scientific committee on tuberculosis in animals meetings, Paris 1992. *IUATLD Newsletter*, March 1993:14-15.
- Huebner RE, Good RC, Tokars JL. Current practices in mycobacteriology: results of a survey of public health laboratories. *J. Clin. Microbiol* 1993; 31:771-775.
- Hughes S, Rodgers M. Tuberculosis vaccine development. 3. Badgers and Possums. En The feasibility of developing a vaccine against tuberculosis for use in the badger (*Meles meles*). Report of a Steering Committee. Apendix 1.: Collins DJ, Ellis W (Eds). Dublin and Belfast, Department of Agriculture, Food and Forestry and Department of Agriculture for Northern Ireland 1994:35-36.
- Huitema H. The eradication of bovine tuberculosis in cattle in the Netherlands and the significance of man as a source of infection for cattle. *The Royal Netherlands Tuberculosis Association* 1969; 12:62-67.
- Hunter S, Brennan P. Evidence for the presence of a phosphatidylinositol anchor on the lipoarabinomannan and lipomannan of *M. tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 1990; 265:9272-9279.
- Hurley SS, Splitter GA, Welch RA. Deoxyribonucleic acid relatedness of *Mycobacterium paratuberculosis* to others members of the family *Mycobacteriaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1988; 38:143-146.
- Huygen K, Abramowicz D, Vandenbussche P. Spleen cell cytokine secretion in *Mycobacterium bovis* BCG-infected mice. *Infect. Immun.* 1992; 60:2880-2886.
- Hülphers G, Lilleengen K. *Svensk Veterinärtidskrift* 1947; 52:193.
- Imaeda T, Kanetsuna F, Galindo B. Ultrastructure of cell walls of genus *Mycobacterium*. *J. Ultrastruct. Res.* 1968; 25:46-63.
- Imaeda T. Deoxyribonucleic acid relatedness among selected strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* (BCG), *Mycobacterium microti*, and *Mycobacterium africanum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1985; 35:147-150.
- Inderlied CB, Kempe CA, Bermúdez LE. The *Mycobacterium avium* complex. *Clin. Microbiol. Rev.* 1993; 6:266-310.

Innis MA, Gelfand DH. Optimization of PCRs. PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press. 1990.

Isaac J, Whitehead J, Adams JW, Barton MD, Coloe P. An outbreak of *Mycobacterium bovis* infection in cats in an animal house. Aust. Vet. J. 1983; 60:243-245.

Ishida T, Washizu T, Toriyabe K. Feline immunodeficiency virus infection in cats of Japan. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 1989; 194:221-225.

Ishiguro N, Sato G. Nucleotide sequence of insertion sequence IS3411 which flanks the citrate utilization determinant of transposon Tn3411. J. Bacteriol. 1988; 170:1902-1906.

Ivanyi J, Morris JA, Keen M. Studies with monoclonal antibodies to mycobacteria. En Monoclonal antibodies against bacteria. vol I. Macario AJL, Macario EC (Eds.), Academic Press Inc. New York (USA) 1985;59-90.

Ivanyi J, Sharp K. Control by H-2 genes of murine antibody responses to protein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. Immunology 1986; 59:329-332.

Janis EM, Kaufmann SH, Schwartz RH, Pardoll DM. Activation of gamma-delta T cells in the primary immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. Science 1989;244:713-716.

Jarnagin JL, Brennan PJ, Harris SK. Rapid identification of *Mycobacterium bovis* by a thin-layer chromatographic technique. Amer. J. Vet. Res. 1983; 44:1920-1921.

Jarret WFH, Lauder I. A summary of the main diagnostic points in tuberculosis in the dog and cat. Vet. Rec. 1957; 69:932-933.

Jennings AR. The distribution of tuberculous lesions in the dog and the cat with reference to the pathogenesis. Vet. Rec. 1949; 61:380-385.

Jensen KA. Reinzüchtung und typenbestimmung von Tuberkelbazillenstämmen. Zbl. Bakt. Abt. 1932:125-132.

Jones WD, Kubica GPJ. The use of MacConkey's agar for the differential typing of *Mycobacterium fortuitum*. Amer. J. Med. Technol. 1964; 30:187-190.

Jones DM, Manton V, Cavanagh P. Tuberculosis in a herd of Axis deer (*Axis axis*) at Whipsnade Park. Vet. Rec. 1976; 98:525-526.

Jones SL, Cox JC, Shepherd JM, Rothel JS, Wood PR, Radford AJ. Removal of false-positive reactions from plasma in an enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma. J. Immunol. Meth. 1992; 155:233-240.

Jordan HL, Cohn LA, Armstrong PJ. Disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in three Siamese cats. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 1994; 204:90-93.

Jorgensen JB, Clausen B. Mycobacteriosis in roe deer caused by wood-pigeon mycobacteria. Nord. Vet. Med. 1976;28:539-546.

Juan C, Fernández J, Domingo M, Adúriz G. Tuberculosis aviar en aves no domésticas. Med. Vet. 1996; 13:135-151.

Jubb KVF, Kennedy PC. Patología de los animales domésticos. Editorial Hemisferio Sur Academic Press, Inc. 1980;I-II.

Kamerbeek J, Schouls L, van Agterveld M, Bunschoten A, van Soolingen D, van Embden JDA. Spoligotyping, a method to detect and type *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. 1995. Unit Molecular Microbiology and Laboratory of Bacteriology, National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands.

- Kamerbeek J, Schouls L, van Agterveld M, Kolk A, Kuijper S, van Soolingen D, de Haas P, Bunschoten A, van Embden J. Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and control of tuberculosis. Enviado a publicar.
- Kamijo R, Le J, Shapiro D, et al. Mice that lack the interferon-gamma receptor have profoundly altered responses to infection with bacillus Calmette-Guérin and subsequent challenge with lipopolysacchride. J. Exp. Med. 1993;178:1435-1440.
- Kaplan G, Gandhi RR, Weinstein DE, et al. *Mycobacterium leprae* antigen-induced suppression of T cell proliferation in vitro. J. Immunol. 1987; 138:3028-3034.
- Karlson AG, Lessel EF. *Mycobacterium bovis* nom. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 1970; 20:273-282.
- Karlson AG, Carr DT. Tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. Ann. Int. Med. 1970; 78:979-983.
- Karupiah G, et al. Inhibition of viral replication by gamma-interferon induced nitric oxide synthase. Science 1993; 261:1445-1448.
- Kataria YP. Observations on human infection with *Mycobacterium bovis*. Tubercle 1969; 50:14-21.
- Kato M. Effect of anti-cord factor antibody on experimental tuberculosis in mice. Infect. Immun. 1973; 7:14-21.
- Kato M, Goren MB. Synergistic action of cord factor and mycobacterial sulfatides on mitochondria. Infect. Immun. 1974; 10:733-741.
- Kaufhold A, Podbielski A, Baumgarten G, Bolkpoel M, Top J, Schuls L. Rapid typing of group A streptococci by the use of DNA amplification and nonradioactive allele specific oligonucleotide probes. FEMS Microbiol. Lett. 1994; 119:19-26.
- Kaufmann SHE. CD8+ T lymphocytes in intracellular microbial infections. Immunol. Today 1988; 9:168-174.
- Kaufmann SHE. Immunity to mycobacteria. Res. Microbiol. 1990; 141:765-768.
- Kaufmann SHE, van Embden JDA. Tuberculosis: a neglected disease strikes back. Trends in Microbiology 1993; 1:2-5.
- Kauppinen J, Mäntyjärvi R, Katila ML. Random amplified polymorphic DNA genotyping of *Mycobacterium malmoense*. J. Clin. Microbiol. 1994; 32:1827-1829.
- Kazda J, Cook BR. Mycobacteria in pond waters as a source of non-specific reactions to bovine tuberculin in New Zealand. N. Z. Vet. J. 1988; 36:184-188.
- Kazda J, Stackenbrandt E, Smida J, Minnikin DE, Daffe M, Parlett JH, Pitulle C. *Mycobacterium cookii* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol 1990; 40:217-223.
- Kazwala RR, Catley AP, Daborn JC. The zoonotic importance of bovine tuberculosis in Tanzania. In Proceedings of the 10th Conference of the Tanzania Veterinary Association. Arusha, 1992.
- Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB. Production of transforming growth factor beta in human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. J. Exp. Med 1986; 163:1037-1050.
- Kehrli ME, Nonnecke BJ, Roth JA. Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. Am. J. Vet. Res. 1989; 50:215-220.
- Kelly WR, Collins JD. The health significance of some infectious agents present in animal effluents. Vet. Sci. Commun. 1978; 2:95-103.
- Kent PS, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: A guide for the Level III Laboratory. Atlanta: US

Department of Human and Health Services, Centers for Disease Control, 1985.

Kerr WR, Lamont HG, McGirr JL. Studies on tuberculin sensitivity in the bovine. *Vet. Rec.* 1946;58:451-453.

Kersulyte D, Woods JP, Keath EJ, Goldman WE, Berg DE. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J. Bacteriol.* 1992; 174:7075-7079.

Kesten SH. Tuberculosis in a mule. *Can. J. Compar. Med.* 1949; 13:29.

Kestle DG, Abbott VD, Kubica GP. Differential identification of *Mycobacteria*. II. Subgroups of Groups II and III (Runyon) with different clinical significance. *Amer. Rev. Respir. Dis.* 1967; 95:1041-1052.

Ketterer PJ, Rogers RJ, Donald B. Pathology and tuberculin sensitivity in cattle inoculated with *Mycobacterium avium* complex serotypes 6, 14 and 18. *Aust. Vet. J.* 1981; 57:61-65.

Keymer I F., Jones DM, Pugsley SL, Wadsworth PF. A survey of tuberculosis in birds in the Regent's Park Gardens of the Zoological Society of London. *Avian Pathol.* 1982; 11:563-569.

Kim D-Y, Cho D-Y, Newton JC, Gerdes J, Richter E. Granulomatous myelitis due to *Mycobacterium avium* in a dog. *Vet. Pathol.* 1994; 31:491-493.

Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassalli P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 1989; 56:731-740.

Kirihara JM, Hillier SL, Coyle MB. Improved detection times for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* with the BACTEC radiometric system. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22:841-845.

Kirschner P, Springer B, Vogel U. Genotypic identification of *Mycobacteria* by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical Laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:2882-2889.

Kleeberg HH, Nel EE. Porcine mycobacterial lymphadenitis. *Journal of the South African Veterinary Medicine Association* 1969; 40(3):233-250.

Kocagöz T, Yilmaz E, Özkara S, Kocagöz S, Hayran M, Sachedeva M, Chambers HF. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by polymerase chain reaction using a simplified procedure. *J. Clin. Microbiol* 1993; 31:1435-1438.

Koch R. Die aetologie der tuberculose. *Berliner Klinische Wochenschrift* 1882;XIX:221.

Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 1991; 72:1-6.

Kohne DE, Steigerwalt AG, Brenner DJ. Nucleic acid probe specific for members of the genus *Legionella*. *Legionella*: proceedings of the 2nd international symposium. American Society of Microbiology 1984:107-108.

Konno K. New chemical method to differentiate human-type tubercle bacilli from other mycobacteria. *Science* 1956; 124:985.

Konno K, Hedmann IM, McDermott W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Amer. Rev. Respir. Dis.* 1967; 95:461-469.

Kormendy B. Report of meetings of IUATLD scientific committee on tuberculosis in animals, Paris. October 15-16, 1992. *IUATLD Newsletter*, March 1993:14-16.

Krahenbuhl JL, Remington JS, McLeod R. Cytotoxic and microbicidal properties of macrophages. En Mononuclear phagocytes-functional aspects. Proceedings of the Third Conference on Mononuclear Phagocytes. van Furth R (Ed.), Martinus Nijhoff, Amsterdam (The Netherlands). 1980:1631-1653.

- Krahenbuhl JL. Role of mycobacterial constituents in regulation of macrophage effector function. En *Virulence mechanisms of bacterial pathogens* (2 ed), Roth JA (Ed). American Society for Microbiology, Washington DC (USA) 1995:97-114.
- Krambovitis E. Serodiagnosis of tuberculosis in perspective. *Serodiagnosis and Immunotherapy* 1987;1:7-19.
- Kramer F, Modilevsky T, Waliany AR, Leedom JM, Barnes PF. *Amer. J. Med.* 1990; 89:451.
- Krasnow I, Wayne LG. Comparison of methods for tuberculosis bacteriology. *Appl. Microbiol.* 1969; 18:915-917.
- Kubica GP, Vestal AL. The arylsulfatase activity of acid-fast bacilli. I. Investigation of stock cultures of acid-fast bacilli. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1961; 83:728-732.
- Kubica GP, Dye WE, Cohn ML, Middlebrook G. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1963; 87:775-779.
- Kubica GP, Kaufmann AJ, Dye WE. Comments on the use of the new mucolytic agent, N-acetyl-L-cysteine as a sputum digestant for the isolation of mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1964; 84:284-286.
- Kubica GP, Jones WDJ, Abbott VD, Beam RE, Kilburn JO, Cater JCJ. Differential identification of mycobacteria. I. Test on catalase activity. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1966; 94:400-405.
- Kubica GP, Baess I, Gordon RE, et al. A co-operative numerical analysis of rapidly growing mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 1972; 73:55-70.
- Kubica GP. Differential identification of mycobacteria. VII. Key features for identification of clinically significant mycobacteria. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1973; 107:9-21.
- Kubica GP, Vitvitsky J. Comparison of two commercial formulations of the MacConkey agar test for mycobacteria. *Appl. Microbiol.* 1974; 27:917-919.
- Kunkle GA, Gulbas NK, Fakok V, et al. Rapidly growing mycobacteria as a cause of cutaneous granulomas: Report of five cases. *J. Amer. Animal Hosp. Assoc.* 1983; 19:513-521.
- Kunze ZM, Wall S, Appelberg R, Silva MT, Portaels F, McFadden JJ. IS901, a new member of widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity in *Mycobacterium avium*. *Mol. Microbiol.* 1991; 5:2265-2272.
- Kunze ZM, Portaels F, McFadden JJ. Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS901. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30:2366-2372.
- Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339:237-238.
- Lafont P, Lafont J. *Rec. Méd. Vét.* 1966; 144:611.
- Lawrence WE, Wickham N. Cat leprosy: infection by a bacillus resembling *Mycobacterium lepraemurium*. *Aust. Vet. J.* 1963; 39:390-393.
- Lebek G. Dependence of the oxygen optimal concentration of both strains of mammalian *Mycobacterium tuberculosis* on the nutritive substrate. *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde. Infektionskrankheiten und Hygiene.* 1959; Abt.1 Originale. 176:530-537.
- Lebrun L, Espinasse F, Poveda JD, Vincent-Levy-Frébault. Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30:2476-2478.
- Lechevalier MP, Lechevalier H. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1970; 20:435-444.

Legendre AM, Mallman VH, Michel RL. Migration-inhibition response of peripheral leukocytes to tuberculin in cats sensitized with viable *Mycobacterium bovis* (BCG). *Amer. J. Vet. Res.* 1977; 38:819-822.

Lehmann PF, Lin D, Lasker BA. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30:3249-3254.

Lehmann KB, Neumann. *Atlas und Grundris der Bakteriologie und Lehrbuch der Speziellen Bakteriologischen Diagnostik*. 1896. J.F. Lehmann, Munich.

Lehn M, Weiser WY, Engelhorn S. IL-4 inhibits H₂O₂ production and antileishmanial capacity of human cultured monocytes mediated by IFN- γ . *J. Immunol.* 1989; 143:3020-3024.

Lenzini L, Rotolli P, Rotolli L. The spectrum of human tuberculosis. *Clin. Experim. Immunol.* 1977; 27:230-237.

Lepper AWD, Pearson CW. The route of infection in tuberculosis of beef cattle. *Aust. Vet. J.* 1973; 49:266-267.

Lepper AWD, Pearson CW. The indirect fluorescent antibody test for the detection of circulating antibodies in bovine tuberculosis. *Aust. Vet. J.* 1975; 51:256-261.

Lepper AWD, Pearson CW, Corner LA. Anergy to tuberculin in beef cattle. *Aust. Vet. J.* 1977; 53:214-216.

Lepper AWD, Newton-Tabrett DA, Corner LA. The use of bovine PPD tuberculin in the single caudal fold test to detect tuberculosis in beef cattle. *Aust. Vet. J.* 1977; 53:208-213.

Lepper AWD, Corner LA, Pearson CW. Serological responses in experimental bovine tuberculosis. *Aust. Vet. J.* 1977; 53:301-305.

Lepper AWD, Carpenter MT, Williams OJ. Comparison of the efficiency of two doses of bovine PPD tuberculin in single caudal fold tests on Australian cattle. *Aust. Vet. J.* 1979; 55:251-256.

Lepper AWD, Corner LA. Naturally occurring mycobacterioses of animals. En *The Biology of the Mycobacteria: immunological and environmental aspects*. Stanford (Ed). Academic Press, London 1983:418-521.

Lesslie IW, Hebert CN, Burn KJ, McClancy BN, Donnelly WJC. Comparison of the specificity of human and bovine tuberculin PPD for testing cattle. *Vet. Rec* 1975; 96: 332-341.

Lesslie IW. A comparison of biological and some cultural methods for the primary isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Comparat. Pathol.* 1959; 69:1-9.

Lesslie IW. Vaccination of cattle with BCG. *Vet. Rec.* 1965; 77:1565-1566.

Lesslie IW, Birn KJ, Stuart P, O'Neill PAF, Smith J. Tuberculosis in the pig and the tuberculin test. *Vet. Rec.* 1968; 83:647-651.

Lesslie IW. Cross infections with mycobacteria between animals and man. *Bull. Int. Un. Tuberc.* 1968; 41:285.

Lesslie IW, Birn KJ. *Mycobacterium avium* infections in cattle and pigs in Great Britain. *Tubercle* 1970; 51:446-451.

Lesslie IW, Magnus K, Stewart CJ. The prevalence of bovine type tuberculosis infection in man in the English rural population. *Tubercle* 1972; 53:198-204.

Lesslie IW, Denham DA, Nancy Hebert C. The relationship between length of incubation, bacterial growth and tuberculin yield of a strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle* 1975; 56:45-53.

Levine PP. A report on tuberculosis in wild deer (*Odocoileus virginianus*). *Cornell Veterinary* 1934; 24:264-266.

Lewis JCM. Cutaneous mycobacteriosis in a Southern sealion. *Aquatic Mammals* 1987; 13:105-108.

- Lévy-Frébault VV, Portaels F. Proposed minimum standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1992; 42:315-323.
- Liew FY, Cox FEG. Non-specific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunol Today* 1990; 12:A17-A21.
- Liébana E, Aranaz A, Mateos A, Vilafranca M, Gómez-Mampaso E, Tercero JC, Alemany J, Suárez G, Domínguez L. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:33-39.
- Liébana E, Aranaz A, Mateos A, Vidal D, Suárez G, Domingo M, Domínguez L. Efectos del método de descontaminación y medio de cultivo sobre el aislamiento de *Mycobacterium bovis* a partir de tejidos animales. XV Congreso de la sociedad Española de Microbiología, Madrid 1995:99.
- Liébana E, Aranaz A, Francis B, Cousins D. Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* 1996;34:933-938.
- Liébana E, Aranaz A, Mateos A, Domínguez L, Vilas F, Sánchez LP. Infecciones por *Mycobacterium bovis* en el hombre: ¿una realidad infravalorada en nuestro país? *Boletín Epidemiológico Semanal*, 1996. 3(1995):181-188.
- Linton CJ, Jalal H, Leeming JP, Millar MR. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32:2169-2174.
- Little TWA, Naylor PF, Wilesmith JW. Laboratory study of *Mycobacterium bovis* infection in badgers and calves. *Vet. Rec.* 1982; 111:550-557.
- Liu SK, Weitzman I, Johnson GG. Canine tuberculosis. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 1980; 177:164-167.
- Livingstone PG. TB in New Zealand - Where have we reached? 1991.
- Ljungqvist L, Worsaae A, Heron I. Antibody responses against *Mycobacterium tuberculosis* in 11 strains of inbred mice: novel monoclonal antibody specificities generated by fusions, using spleens from BALB.B10 and CBA/J mice. *Infect. Immun.* 1988; 56:1994-1998.
- Long ER, Aronson JD, Seibert FB. Tuberculin surveys with the purified protein derivative: The determination of optimum dosage. *Am. Rev. Tuberc.* 1934; 30:733.
- Long ER, Seibert FB, Aronson JD. A standardised tuberculin (purified protein derivative) for uniformity in diagnosis and epidemiology. *Tubercle* 1935; 16:304.
- Lovell R, White EG. Naturally occurring tuberculosis in dogs and some other species of animals. Part 11. Animals other than dogs. *Brit. J. Tuberc.* 1941; 35:28-40.
- Lowrie DB. Is macrophage death on the field of battle essential to victory, or a tactical weakness in immunity against tuberculosis? *Clin. Exp. Immunol.* 1990;80:301-303.
- López A. Disease Control Priorities in Developing Countries. Jamison DT, Mosely WH (Oxford Univ. Press for the World Bank) 1992:21.
- Löwenstein. Die Züchtung und typenbestimmung von Tuberkelbazillenstämmen. *Zbl. Bakt. Abt.* 1931:125-132.
- Lumeij JT, Hajer R, Dik KJ, Dorrestein GM, Engel HWB. Diagnosis of pulmonary *Mycobacterium bovis* infection in a tiger. *Vet. Rec.* 1987; 28:302-304.
- Lungu O, Latta PD, Weitzman I, Silverstein, S. Differentiation of *Nocardia* from rapidly growing *Mycobacterium* species by PCR-RFLP analysis. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 1994; 18:13-18.
- MacGowan AP, O'Donaghue K, Nicholls S, McLauchlin J, Bennett PM, Reeves DS. Typing of *Listeria* spp. by

- random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. J. Med. Microbiol. 1993; 38:322-327.
- Mackanness GB. The immunological basis of acquired cellular resistance. J. Exp. Med. 1964; 120:105-120.
- Mackanness GB. The relationship of delayed hypersensitivity to acquired cellular resistance. Br. Med. Bull. 1967; 23:52-54.
- MacPherson JM, Eckstein PE, Scoles GJ, Gajadhar AA. Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentrations. Mol. and Cell. Probes 1993; 7:293-299.
- Macwhirter P. Passeriformes. En Avian Medicine. Principles and Practice. Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR (Eds). Wingers Publishing, Lake Worth, Florida (USA) 1994;1173-1199.
- Magnus K. Epidemiologic basis of tuberculosis eradication. 3. Risk of pulmonary tuberculosis after human and bovine infection. Bull. World Health Organisation 1966; 35:483-508.
- Majiwa PA, Maina M, Waitumbi JN, Mihok S, Zweygarth E. *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*: molecular characterization of a new genotype from Tsavo, Kenya. Parasitol. 1993; 106:151-162.
- Malik R, Hunt GB, Goldsmid SE, Martin P, Wigney DI, Love DN. Diagnosis and treatment of pyogranulomatous panniculitis due to *Mycobacterium smegmatis* in cats. J. Small Animal Pract. 1994; 35:524-530.
- Mandel M, Marmur J. Use of ultraviolet absorbance temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. Methods Enzimol. 1968; 12:195-206.
- Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG. Natural killer cell stimulatory factor interleukin 12 (IL-12) induces T helper type 1 (Th1) specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. J. Exp. Med. 1993; 177:1199-1204.
- Mangura BT, Reichman LB. Prevention and treatment of *Mycobacterium avium* complex infection. Res. Microbiol. 1994; 145:181-187.
- Maniatis T, Frisch EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (USA) 1982.
- Mann PC, Bush M, Janssen DL, Frank ES, Montali RJ. Clinicopathologic correlations of tuberculosis in large zoo mammals. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1981; 179:1123-1129.
- Marks J, Jenkins PA, Kilpatrick GS, Engbaek HC, Vergman V. Pulmonary tuberculosis due to BCG. Br. Med. J. 1971; 3:229.
- Marks J. Occasional survey - a system for the examination of tubercle bacilli and other mycobacteria. Tubercle 1976; 57:207-225.
- Martín C, Ranes M, Gicquel B. Plasmids, antibiotic resistance and mobile genetic elements in mycobacteria. En: Molecular biology of the mycobacteria. McFadden JJ (Ed). Academic Press Ltd, London (UK). 1990.
- Martínez OM, Gibbons RS, Garovoy MR. IL-4 inhibits IL-2 receptor expression and IL-2-dependent proliferation of human T cells. J. Immunol. 1990; 144:2211-2215.
- Mason FE. Tuberculosis in camels. J. Comp. Pathol. 1917; 30:80-84.
- Matsunaga I, Oka S, Inoue T, Yano I. Mycolyl glycolipids stimulate macrophages to release chemotactic factors. FEMS Microbiol. Lett. 1990; 67:49-54.
- Matthews PR, McDairmid A, Collins P, Brown A. The dependence of some strains of *Mycobacterium avium* on mycobactin for initial and subsequent growth. J. Med. Microbiol. 1977; 11:53-57.

- Matthews PRJ, McDiarmid A. The production in bovine calves of a disease resembling paratuberculosis with a *Mycobacterium* sp. isolated from a woodpigeon (*Columba palumbus* L.). Vet. Rec. 1979; 104:286.
- Mausner JS, Kramer S. Epidemiology-an introductory text (2 ed.). The W.B. Saunders Company, Philadelphia 1985.
- Mazurek GH, Cave MD, Eisenach KD, Wallace RJI, Bates JH, Crawford JT. Chromosomal DNA fingerprint patterns produced with IS6110 as strain-specific markers for epidemiologic study of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 1991; 29:2030-2033.
- Mazurier SI, Wernans K. Typing of *Listeria* strains by random amplification of polymorphic DNA. Res. Microbiol. 1992; 143:499-505.
- McAdam RA, Hermans PWM, van Soolingen D, Zainuddin ZF, Catty D, van Embden JDA, Dale JW. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. Mol. Microbiol. 1990; 4:1607-1613.
- McCarthy J. The badger vaccination trial in West Cork: Progress report. En The Badger (Proceedings of a seminar held on 6-7 March, 1991). Hayden TJ (Ed) .Dublin: Royal Irish Academy 1993:181-188.
- McClatchy JK. The seroagglutination test in the study of nontuberculous *Mycobacteria*. Rev. Infect. Dis. 1981; 3:867-870.
- McDiarmid A. The occurrence of tuberculosis in the wild wood pigeon. J. Comp. Pathol. 1948; 58:128-133.
- McDonough KA, Kress Y, Bloom BR. Pathogenesis of tuberculosis - interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. Infect. Immun. 1993; 61:2763-2773.
- McFadden JJ, Butcher PD, Chiodini RJ, Hermon-Taylor J. Determination of genome size and DNA homology between an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease and other mycobacteria. J. Gen. Microbiol. 1987; 133:211-214.
- McFadden JJ, Butcher PD, Choidini R, Hermon-Taylor J. Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. J. Clin. Microbiol. 1987; 25:796-801.
- McFadden JJ, Butcher PD, Thompson J, Chiodini R, Hermon-Taylor J. The use of DNA probes identifying restriction fragment length polymorphisms to examine the *Mycobacterium avium* complex. Mol. Microbiol. 1987; 1:283-291.
- McFadden JJ, Kunze Z, Seechurn P. DNA probes for detection and identification. Molecular Biology of the Mycobacteria. McFadden JJ (Ed). Academic Press Ltd, London (UK) 1990.
- McFadyean J. Results of the application of the tuberculin test to Her Majesty's cows at Windsor. J. Comp. Pathol. 1899; 12:50-56.
- McIlroy SG, Neill SD, McCracken RM. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. Vet. Rec. 1986; 118:718-721.
- McIntosh DW. Feline leprosy: a review of forty-four cases from western Canada. Can. Vet. J. 1982; 23:291-295.
- McKelvey WAC. Johne's disease in deer. Publication of the Veterinary Deer Society 1987;2:24-28.
- McKeown T. Medicine in modern society. Allen G and Unwin Ltd. (Ed), London (UK). 1965.
- McKeown T. Los orígenes de las enfermedades humanas. Ed. Crítica 1990.
- McLaughlin AA. An episode of *M. bovis* infection in pigs. Surveillance 1989; 16:23-24.

McMurray DN, Mintzer CL, Bartow RA, Parr RL. Dietary protein deficiency and *Mycobacterium bovis* BCG affect interleukin-2 activity in experimental pulmonary tuberculosis. *Infect. Immun.* 1989; 57:2606-2611.

Meissner G, Schröder K. Über sogenannte afrikanische-Stämme aus dem tropischen West-Africa. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. I. Abteilung Originale* 1969; 211:69-81.

Meissner G, Schröder KH, Amadis GE. A co-operative numerical analysis of nontuberculous and nonphotochromogenic slowly growing mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 1974; 83:207-235.

Meissner PS, Falkingham JO. Plasmid DNA profiles as epidemiological markers for clinical and environmental isolates of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium scrofulaceum*. *J. Infect. Dis.* 1986; 153:325-331.

Mercier M, Gaucher C, Feugas O, Mazurier C. Direct PCR from whole blood, without DNA extraction. *Nucl. Acids Res.* 1990; 18:5908.

Merkal RS. Paratuberculosis: advances in cultural, serologic, and vaccination methods. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 1984; 184:939-943.

Meunier JR, Grimont PD. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* 1993; 144:373-379.

Middlebrook G, Dubos RJ, Pierce CH. Virulence and morphological characteristics of tubercle bacilli. *J. Exp. Med.* 1947; 86:175-184.

Middlebrook G, Reggiardo Z, Tigertt WD. Automatable radiometric detection of growth of *Mycobacterium tuberculosis* in selective media. *Amer. Rev. Respir. Dis.* 1977; 115:1066-1069.

Miller SD, Jones HE. Correlation of Lymphocyte transformation with tuberculin skin test sensitivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1973; 107:530-538.

Miller EB. Tuberculous cattle problem in the United States to 1917. *Hist. Med. Vet.* 1989; 14:1-64.

Minden P, Kelleher PJ, Freed JH. Immunological evaluation of a component isolated from *Mycobacterium bovis* BCG with monoclonal antibody to *M. bovis* BCG. *Infect. Immun.* 1984; 46:519-525.

Minnikin DE, Goodfellow M. Lipid composition in the classification and identification of acid-fast bacteria. *Microbiological Classification and Identification*. Goodfellow M, Board RG (Eds). Academic Press. 1908:189-256.

Minnikin DE, Parlett JH, Magnusson M, Ridell M, Lind A. Mycolic acid patterns of representatives of *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Gen. Microbiol.* 1984; 130:2733-2736.

Mirsky ML, Morton D, Piehl JW, Gelberg H. *Mycobacterium bovis* infection in a captive herd of Silka deer. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 1992; 200:1540-1542.

Misaki A, Seto N, Azuma I. Structure and immunological properties of D-arabino-D-galactans isolated from cell walls of *Mycobacterium* species. *J. Biochem.* 1974; 76:15-27.

Miyazaki Y, Koga H, Kohno S, Kaku M. Nested polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:2228-2232.

Monaghan ML, Kazda JF, McGill K, Cook BM, Quinn PJ. Sensitization of cattle to bovine and avian tuberculosis with *Mycobacterium cookii*. *Vet. Rec.* 1991; 129:383.

Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF. The tuberculin test. *Vet. Microbiol.* 1994; 40:111-124.

Montali RJ, Hirschel PG. Survey of tuberculin testing practices at zoos. *Proceedings Amer. Assoc. Zoo. Vets.*

Annual Meeting, South Padre Island, Texas (USA). 1990.

Montali RJ. Tuberculosis in captive exotic birds. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 1976; 169:920-927.

Montali RJ, Nichols DK, Bush M, Derrickson SR, Pickett C. Control of avian tuberculosis in zoological parks: a perspective. Verh. ber. Erkr. Zoot. 1992; 34:71-76.

Moodie PA. Tuberculin reactions in BCG vaccinated cattle. Brit. Vet. J. 1977; 133:624-625.

Moore FM, Kennedy FA, Carpenter JL. What is your diagnosis? Veterinary Clinical Pathology 1988; 17:7-8.

Morales P, Madin SH, Hunter A. Systemic *Mycobacterium marinum* infection in an Amazon manatee. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 1985; 187:1230-1231.

Mordarski M, Goodfellow M, Tkacz A, Pulverer G, Schaal KP. Ribosomal ribonucleic acid similarities in the classification of *Rhodococcus* and related taxa. J. Gen. Microbiol. 1980; 118:313-319.

Moreno C, Mehlert A, Lamb J. The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal human T-cell proliferation. Clin. Exp. Immunol. 1988; 74:206-210.

Moreno C, Taverne J, Mehlert A. Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* induces the production of tumor necrosis factors from human and murine macrophages. Clin. Exp. Immunol. 1989; 76:240-245.

Morgan MA, Horstmeier CD, DeYoung DR, Roberts GD. Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear-negative specimens. J. Clin. Microbiol. 1983; 18:382-388.

Morris JA, Stevens AE, Stuart P, Little WA. A pilot study to assess the usefulness of ELISA in detecting tuberculosis in badgers. Vet. Rec. 1979; 104:14.

Morris RS, Pfiffer DU, Jackson R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. Vet. Microbiol. 1994; 40:153-177.

Morse DR, Brothwell DR, Ucko PJ. Tuberculosis in ancient Egypt. Amer. Rev. Resp. Dis. 1964; 90:524-541.

Mosmann TR, Moore KW. The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. Immunol. Today 1991; 12:A49-A53.

Moulder JW. Comparative biology of intracellular parasitism. Microbiol. Rev. 1985; 49:298-337.

Moussu M, Mantoux C. cited by Francis, J. 1947. Bovine Tuberculosis, Including a Contrast with Human Tuberculosis 1908 (Staples Press).

Muirhead RH, Gallagher J, Burn KJ. Tuberculosis in wild badgers in Gloucestershire: epidemiology. Vet. Rec. 1974; 95:552-555.

Muller I, Cobbold SP, Waldmann H, Kaufmann SHE. Impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection after selective in vivo depletion of L3T4+ and Lyt-2+ T cells. Infect. Immun. 1987; 55:2037-2041.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Meth. Enzymol. 1987; 155:335-351.

Munk ME, Gatrill AJ, Kaufmann SHE. Target cell lysis and IL-2 secretion by gamma/delta T lymphocytes after activation with bacteria. J. Immunol. 1990; 145:2434-2439.

Muralidharan K, Wakeland EK. Concentration of primer and template qualitatively affects products in random amplified polymorphic DNA PCR. BioTechn. 1993; 14:362-364.

Murphy DB, Hawkins JE. Use of urease test disks in the identification of mycobacteria. J. Clin. Microbiol. 1975; 1:465-468.

Murray HW, Juangbhanich CW, Nathan CF, Cohn ZA. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. J. Exp. Med. 1979; 158:670-689.

Murray HW, Rubin BY, Carriero SM, Harvis AM, Jaffee EA. Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. 1985; 52:151-158.

Murray CLJ, Styblo K, Rouillon A. Disease Control Priorities in Developing Countries. Jamison DT, Mosley WH. Oxford Univ. Press for the World Bank. 1992:50.

Muscoplat CC, Thoen CO, Chen AW, Johnson DW. Development of specific in vitro lymphocyte responses in cattle infected with *Mycobacterium bovis* and with *Mycobacterium avium*. Amer. J. Vet. Res. 1975; 36:395-398.

Muscoplat CC, Thoen CO, McLaughlin RM, Thoenig JR, Chen AW, Johnson DW. Comparison of lymphocyte stimulation and tuberculin skin reactivity in *Mycobacterium bovis*-infected *Macaca mulatta*. Am. J. Vet. Res. 1975; 36:699-702.

Muscoplat CC, Johnson DW, Thoen CO, Ayivor MD, Klausner DJ. Development of a whole blood stimulation assay for detecting hypersensitivity to PPD in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. Vet. Microbiol. 1977; 2:261-265.

Musial CE, Tice LS, Stockman L, Roberts GD. The identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe rapid diagnostic system for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* complex. J. Clin. Microbiol. 1988; 26:2120-2123.

Mutalib AA, Riddell C. Epizootiology and Pathology of Avian Tuberculosis in Chickens in Saskatchewan. Can. Vet. J. 1988; 29:840-842.

Myers LE, Silva SVPS, Procunier JD, Little PB. Genomic fingerprinting of *Haemophilus somnus* isolates by using a random-amplified polymorphic DNA assay. J. Clin. Microbiol. 1993; 31:512-517.

Myrvik QN, Leake ES, Wright MJ. Disruption of phagosomal membranes of normal alveolar macrophages by the H37Rv strain of *Mycobacterium tuberculosis*. Am. Rev. Respir. Dis. 1984; 129:322-328.

Nadal D, Caduff R, Kraft R, et al. Invasive infection with *Mycobacterium genavense* in three children with the acquired immunodeficiency syndrome. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1993; 12:37-43.

Nagai S, Matsumoto J, Nagasuga T. Specific skin-reactive protein from the culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG. Infect. Immun. 1981; 31:1152-1160.

Nagai S, Wiker HG, Harboe M, Kinomoto M. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. Infection and Immunity 1991; 59:372-382.

Nathan CF, Root RK. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages. Dependence on sequential activation and triggering. J. Exp. Med. 1977; 146:1648-1662.

Nathan CF, Murray HE, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of the gamma-interferon as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. J. Exp. Med. 1983; 158:670-689.

Nathan CF. Macrophages secretory products. J. Clin. Invest. 1987; 79:319-326.

Natsuka S, Akira S, Nish Y, et al. Macrophage differentiation specific expression of NF-IL6, a transcription factor for interleukin-6. Blood 1992; 79:460-466.

Neill SD, Hanna J, O'Brien JJ, McCracken RM. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected

cattle. Vet. Rec. 1988; 123:340-343.

Neill SD, O'Brien JJ, Hanna J. A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle. Vet. Microbiol. 1991; 28:103-109.

Neill SD, Cassidy J, Hanna J, et al. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. Vet. Rec. 1994; 135:134-135.

Neill SD, Pollock JM, Bryson DB, Hanna J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet. Microbiol. 1994; 40:41-52.

Neill SD, Hanna J, Pollock J. The diagnosis of bovine tuberculosis by blood testing. Proc. Soc. Vet. Epidem. Prev. Med. 1994.

Newbury HJ, Ford-Loyd BV. The use of RAPD for assessing variation in plants. Plant Growth Regul. 1993; 12:43-51.

Newell DG, Hewinson RG. Control bovine tuberculosis by vaccination. Vet. Rec. 1995; 135:459-463.

Nilsson BS, Magnusson M. Comparison of the biologic activity of tuberculins by the use of Lymphocyte cultures. Amer. Rev. Respir. Dis. 1973; 108:565-570.

Nolan CM, Elarth AM, Barr H, Mahdi Saeed A, Risser DR. Amer. Rev. Resp. Dis. 1991; 143:257.

Nolan A. An investigation of the development of specific antibody responses of badgers (*Meles meles*) to infection with *Mycobacterium bovis* with reference to the pathogenesis and epidemiology of disease. Brunel University, 1991.

Nolan A, Wilesmith JW. Tuberculosis in badgers (*Meles meles*). Vet. Microbiol. 1994; 40:179-191.

Noll H, Bloch H, Asselineau J, Lederer E. The chemical structure of the cord factor of *M. tuberculosis*. Biochim. Biophys. Acta 1956; 20:299-318.

Noll H. The chemistry of some native constituents of the purified wax of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Biol. Chem. 1957; 224:149-164.

Nolte FS, Metccock B, McGowan JEJ. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. J. Clin. Microbiol 1993; 31:1777-1782.

Noordhoek GT, van embden JDA, Kolk AHJ. Questionable reliability of the polymerase chain reaction in the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. New Engl. J. Med. 1993; 329:2036.

Noordhoek GT, Kolk AHJ, Bjune G. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. J. Clin. Microbiol. 1994; 32:277-284.

Novoa C, Pickering J, Izquierdo R, Flores JM, Pizarro M. Contribución al estudio de la tuberculosis (preferentemente pulmonar y mesentérica) en los gatos. Medicina Veterinaria 1986; 3:37-44.

O'Brien RL, Happ MP, Dallas A, Palmer E, Kubo R, Born WK. Stimulation of a major subset of lymphocytes expressing T cell receptor gamma delta by an antigen derived from *Mycobacterium tuberculosis*. Cell 1989; 57:667-674.

O'Connor R, O'Malley E. Badgers and bovine tuberculosis in Ireland. Eradication of animal disease Board, Dept. of Agriculture and Food, Dublin (Ireland). 1989.

O'Grady F, Riley RL. Experimental airborne tuberculosis. Adv. Tuberc. Res. 1963; 12:150-190.

O'Reilly LM, McClancy BN. A comparison of the accuracy of human and bovine tuberculin PPD for testing

cattle with a comparative cervical test. Ir. Vet. J. 1975; 29:63-70.

O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animals and man: a review. Tub. and Lung Dis. 1995; 76 (supl.):1-46.

Ochman H, Whittam TS, Caugant DA, Selander RK. Enzyme polymorphism and genetic population structure in *Escherichia coli* and *shigella*. J. Gen. Microbiol 1983; 129:2715-2726.

Ochman H, Gerber AS, Hartl DL. Genetic applications of an inverse polymerase chain reactions. Genetics 1988; 120:621-623.

Orme IM. Characteristics and specificity of acquired immunologic memory to *Mycobacterium tuberculosis* infection. J. Immunol. 1988; 140:3589-3593.

Orme IM, Miller ES, Roberts AD, et al. T lymphocytes mediating protection and cellular cytolysis during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. J. Immunol. 1992; 148:189-196.

Orr CM, Kelly DF, Lucke VM. Tuberculosis in cats, a report of two cases. J. Small Animal Pract. 1980; 21:247-253.

Ortega A, March J. Algunos aspectos sobre la tuberculina y sus unidades. Materiales y Reactivos, S.A. Monogr. Inst. Llorente 1982

Otal I, Martín C, Vincent-Levy-Frébault V, Thierry D, Gicquel B. Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 1991; 29:1252-1254.

Outteridge PM, Lepper AWD. The detection of tuberculin-sensitive lymphocytes from bovine blood by uptake of radio-labelled nucleosides. Res. Vet. Science 1973; 14:296-305.

Pabst MJ, Gross JM, Brozna JP, Goren MB. Inhibition of macrophage priming by sulfatides from *M. tuberculosis*. J. Immunol. 1988; 140:634-640.

Palittapongarnpim P, Chomyc S, Fanning A, Kunimoto D. DNA fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. J. Infect. Dis. 1993; 167:975-978.

Palmer CE. Tuberculosis sensitivity and contact with tuberculosis. Further evidence of non specific sensitivity. Amer. Rev. Tuberc. 1953; 68:5.

Panigrahy B, Clark FD, Hall CF. Mycobacteriosis in psittacine birds. Av. Dis. 1983; 27:1166-1168.

Pao CC, Lin SS, Wu SY, Juang WM, Chang CH, Lin JY. The detection of mycobacterial DNA sequences in uncultured clinical specimens with cloned *Mycobacterium tuberculosis* DNA as probes. Tubercle 1988; 69:27-36.

Pao CC, Yen TSB, You JB, Maa JS, Fiss EH, Chang CH. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. J. Clin. Microbiol. 1990; 28:1877-1880.

Park CH, Hixon DL, Ferguson CB, Hall SL, Risheim CC, Cook CB. Rapid recovery of mycobacteria from clinical specimens using automated radiometric technic. Amer. J. Clin. Pathol. 1984; 81:341-345.

Parodi A, Fontaine M, Brion A. Mycobacterioses in the domestic carnivora; present-day epidemiology of tuberculosis in the cat and dog. J. Small Animal Pract. 1965; 6:309-326.

Parodi A, Fontaine M, Brion A, Tisseur H, Goret P. Mycobactérioses des carnivores domestiques. Epidémiologie actuelle de la tuberculose du chien et du chat. Rec. Méd. Vét. 1965; CXLI(5):421-432.

Parra CA, Londono LP, del Portillo P, Pattaroyo ME. Isolation, characterization and molecular cloning of a specific *Mycobacterium tuberculosis* antigen gene: Identification of species-specific sequence. Infect. Immun.

1991; 59:3411-3417.

Pato ML. En Mobile DNA. Berg DE, Howe MM (Eds). American Society for Microbiology, Washington DC (USA). 1989.

Pattyn SR, Portaels FG. In vitro cultivation and classification of *Mycobacterium lepraemurium*. Int. J. Lepr 1980; 48:7.

Pattyn SR, Ursi D, Leven M, Raes V, Jamet P. Polymerase chain reaction amplifying DNA coding for species-specific rRNA of *Mycobacterium leprae*. Int. J. Lep. 1992; 60:234-243.

Pearson CW, Corner LA, Lepper AWD. Aust. Vet. J. 1977; 67.

Pearson ML, Jereb JA, Frieden TR, et al. Nosocomial transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a risk to patients and healthcare workers. Ann. Intern. Med. 1992; 117:191-196.

Pedersen NC. Basic and clinical immunology. En Proceedings 49th Annual Meeting, Amer. Animal Hosp. Assoc. 1982:75-84.

Pedrazzini T, Hug K, Louis JA. Importance of L3T4+ and Lyt-2+ cells in the immunologic control of infection with *Mycobacterium bovis* strain bacillus Calmette-Guérin in mice. J. Immunol. 1987; 139:2032-2037.

Penner GA, Bush A, Wise R. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. PCR Meth. Appl. 1993; 2:342-345.

Persing DH. Polymerase chain reaction: Trenches to benches. J. Clin. Microbiol 1991; 29:1281-1285.

Philip PM. Tuberculosis in deer in Great Britain. Deer 1990; 8:27-30.

Pierre C, Lecossier D, Boussougant Y, et al. Use of reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. J. Clin. Microbiol. 1991; 29:712-717.

Piessens WF. Introduction to the immunology of tuberculosis. Rev. Infect. Dis. 1989; 11:436-442.

Plackett P, Ripper J, Corner LA, Small K, de Witte K, Melville L, Hides S, Wood PR. An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. Austr. Vet. J. 1989; 66:15-19.

Platanias LC, Vogelzang NJ. Interleukin-1: Biology, pathophysiology, and cliical prospects. Am. J. Med. 1990; 89:621-629.

Platt J, Grant BW, Eddy AA, Michael AF. Immune cell populations in cutaneous delayed-type hypersensitivity. J. Exp. Med. 1983; 158:1227-1242.

Playfair JHL. Immunology at a glance (4 ed). Blackwell Scientific Publications, Oxford (UK). 1987.

Plikaytis BB, Gelber RH, Shinnick TM. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. J. Clin. Microbiol. 1990; 28:1913-1917.

Plikaytis BB, Eisenach KD, Crawford JT, Shinnick TM. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG by a polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes 1991; 5:215-219.

Plikaytis BB, Plikaytis BD, Yakus MA, Butler WR, Woodley CL, Silcox VA, Shinnick TM. Differentiation of the slowly growing *Mycobacterium* species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol. 1992; 30:1815-1822.

Plum N. A study of avian tuberculosis in cattle. Cornell Vet. 1931; 21:68-76.

- Prat R, Rist N, Dumitrescu N, Mugabushaka A, Clavel S, Duponchel C. Special characteristics of the cultures of tubercle bacilli isolated in Rwanda. *Bull. I.U.A.T.* 1974; 49:53-62.
- Prère MF, Chandler M, Fayet O. Transposition in *Shigella*: isolation and analysis of IS911, a new member of the IS3 group of insertion sequences. *J. Bacteriol.* 1990; 172:4090-4099.
- Price RM. The bovine tubercle bacillus in human tuberculosis. *Amer. J. Med. Sci.* 1939; 197:411-427.
- Prinzis S, Chatterjee D, Brennan P. Structure and antigenicity of lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Gen. Microbiol.* 1993; 139:2649-2658.
- Pritchard WD, Thoen CO, Himes EM, Muscoplat CC, Johnson DW. Epidemiology of mycobacterial lymphadenitis in a Idaho Swine herd. *Amer. J. Epidemiol.* 1977; 106:222-227.
- Pritchard DG, Stuart FA, Wilesmith JW. Tuberculosis in East Sussex. III. Comparison of post-mortem and clinical methods for the diagnosis of tuberculosis in badgers. *J. Hyg.* 1986; 97:27-36.
- Pritchard DG. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: Conquest and controversy. *J. Compar. Pathol.* 1988; 99:357-399.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing 1994:156-169.
- Radford AJ, Duffield BJ, Plackett P. Cloning of a species-specific antigen of *Mycobacterium bovis*. *Infect. Immun.* 1988; 56:921-925.
- Radford AJ, Wood PR, Billman-Jacobe H, Geysen HM, Mason TJ, Tribbick G. Epitope mapping of the *Mycobacterium bovis* secretory protein MPB70 using overlapping peptide analysis. *J. Gen. Microbiol.* 1990; 136:265-272.
- Radunz BL, Lepper AWD. Suppression of reactivity to tuberculin in repeat test. *Aust. Vet. J.* 1985; 62:191-194.
- Rae MA, Rosskopf WJ. Mycobacteriosis in passerines. *Proc. Assoc. Avian Vet.* 1992:234-243.
- Ragg J, Moller H, Waldrup K, Mackintosh C. Ferrets (*Mustela furo*) and bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*); the need for a multispecies approach. Tuberculosis in wildlife and domestic animals, Otago Conference Series No.3 Griffin F, de Lisle G (Eds.) University of Otago Press, Dunedin, New Zealand 1995; 290-293.
- Ralph W. A new test for TB. *Rural Res.* 1989; 144:4-8.
- Ramis A, Ferrer L, Aranaz A, Liébana E, Mateos A, Domínguez L, Pascual C, Fernández-Garayzabal JF, Collins DM. *Mycobacterium genavese* infection in canaries. *Avian Dis.* 1996; 40:246-251.
- Ratnam S, March SB. Effect of relative centrifugal force and centrifugation time on sedimentation of mycobacteria in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 23:582-585.
- Reed GB. Genus *Mycobacterium* (species affecting warm-blooded animals except those causing leprosy). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (7 ed). Breed RS, Murray EGD, Smith NR. The Williams and Wilkins Co. 1957.
- Reiman H, Zaman MR, Ruppanner R, Jorgensen JB, Worsaae H, Behymer D. Paratuberculosis in cattle and free-living exotic deer. *J. Vet. Med. Assoc.* 1979; 174:841-843.
- Remington KH. Atypical mycobacteriosis in a mixed collection of caged birds. *Proc. Assoc. Avian Vet.* 1993:256-262.
- Rempt D. *Veterinary work in the Netherlands 1953*. Netherland Veterinary Service 1954:80.
- Renner M, Bartholomew WR. Mycobacteriologic data from two outbreaks of bovine tuberculosis in nonhuman

primates. Amer. Rev. Resp. Dis. 1974; 109:11-16.

Richards OW, Kline EK, Leach RE. Demonstration of tubercle bacilli by fluorescence microscopy. Am. Rev. Tuberc. 1941; 44:255-266.

Richards WD, Ellis EM, Wright HS, Van Deusen RA. The stimulating effect of tuberculin skin tests on precipitin levels in cattle. Am. Rev. Respir. Dis. 1966; 93:912-919.

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. Int. J. Lepr. 1966; 34:255-273.

Rieder HL, Cauthen GM, Comstock GW, Snider DEJ. Epidemiol. Rev. 1989; 11:79.

Riley LW. Phagocytosis of *M. tuberculosis*. En Tuberculosis. Rom WN Garay S (Eds.). Little, Brown and Co. 1996; 281-289.

Rimbaun SE, Affronti LF. Mycobacterial polysaccharides. II. Comparison of polysaccharides from strains of four species of mycobacteria. J. Bacteriol. 1969; 100:58-63.

Ritacco V, de Kantor IN, Barrera L, Nader A, Bernardelli A, Torrea G, Errico F, Flies E. Assessment of the sensitivity and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of mycobacterial antibodies in bovine tuberculosis. J. Vet. Med. Ser. B 1987; 34:119-125.

Ritacco V, López B, Barrera L, Nader A, Fliess E, de Kantor IN. Further evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. J. Vet. Med. 1990; 37:19-27.

Ritacco V, López B, De Kantor IN, Barrera L, Errico F, Nader A. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. Res. Vet. Science 1991; 50:365-367.

Ritacco V, de Kantor IN. Zoonotic tuberculosis in Latin America. J. Clin. Microbiol. 1992; 30:3299-3300.

Ritchie BW. Avian Therapeutics. Proc. Assoc. Avian Vet. 1990:415-431.

Roach TI, Barton CH, Chatterjee D, Blackwell JM. Macrophage activation: lipoarabinomannan from avirulent and virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially induces the early genes-fos, KC, JE, and tumor necrosis factor- α . J. Immunol. 1993; 150:1886-1896.

Roberts GD, Goodman NL, Heifets L. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *M. tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. J. Clin. Microbiol. 1983; 18:689-696.

Roberts T. A retrospective assessment of human health protection benefits from removal of tuberculous beef. J. Food Protect. 1986; 49:293-298.

Robertson TG. Diagnosis of bovine tuberculosis 1. The evaluation of the tuberculin test. N. Z. Vet. J. 1963; 11:6-10.

Robinson P, Morris D, Antic R. *Mycobacterium bovis* as an occupational hazard in abattoir workers. Austr. N. Z. J. Med. 1988; 18:701-703.

Rocken M, Saurat JH, Hauser C. A common precursor for CD4⁺ T cells producing IL-2 or IL-4. J. Immunol. 1992; 148:1031-1036.

Roffe TJ. Isolation of *Mycobacterium avium* from waterfowl with polycystic livers. Avian Dis. 1989; 33:195-198.

Rogers RJ, Donald BA, Schultz K. The distribution of *Mycobacterium bovis* in Queensland cattle herds with observations on the laboratory diagnosis of tuberculosis. Austr. Vet. J. 1980; 56:542-546.

Rook GAW, Taverne J, Leveton C, Steele J. The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumor

necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol.* 1987; 62:229-234.

Rose HR. Bovine tuberculosis in deer. *Deer* 1987; 7:78.

Ross BC, Raio K, Jackson K, Dwyer B. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiologic tool. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30:942-946.

Rossau R, van Mechele E, de Ley J, van Heuverswijn H. Specific *Neisseria gonorrhoeae* DNA-probes derived from ribosomal RNA. *J. Gen. Microbiol.* 1989; 135:1735-1745.

Roswurm JD, Konya LD. The comparative cervical tuberculin test as an aid to diagnosing bovine tuberculosis. *Proc. of the 77th U.S. Anim. Health. Assoc.* 1973:368-389.

Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Austr. Vet. J.* 1990; 67:134-137.

Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon on whole blood culture. *Austr. Vet. J.* 1992; 69:1-4.

Rothstein E. The Twenty-Ninth Veterans Administration-Armed Forces Pulmonary Disease Research Conference. *Amer. Rev. Respir. Dis.* 1970; 101:788.

Rouillon A, Perdrizet S, Parrot R. Transmission of tubercle bacilli; the effects of chemotherapy. *Tubercle* 1976; 57:275-299.

Rullán JV, Herrera D, Cano R, Moreno V, Godoy P, Peiró EF, Castell J, Ibáñez C, Ortega A, Sánchez L, Pozo F. Nosocomial transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Spain. *Emerging Infect. Dis.* 1996; 2:125-129.

Runyon EH, Selin MJ, Harris HW. Distinguishing mycobacteria by the niacin test. *Amer. Rev. Tuberc.* 1959; 79:663-665.

Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med. Clin. North Am.* 1959; 43:273-290.

Sahadevan R, Narayanan S, Paramasivan CN, Prabhakar R, Narayanan PR. Restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, India, by use of direct-repeat probe. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:3037-3039.

Saliers AA, Whitt DD. Bacterial Pathogenesis. A molecular Approach. ASM-Press 1994; 307-321.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;1350-1354.

Saito H, Gordon RE, Juhlin I, K  ppler W, Kwapinski JBG, McDurmont C, Pattyn SR, Runyon EH, Standford JL, Tarnok I, Tasaka H, Tsukamura M, Weiszfeiler J. Cooperative numerical analysis of rapidly growing mycobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1977; 27:75-85.

Saito H, Tomioka H, Sato K, tasaka H, Dawson DJ. Identification and partial characterization of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* by using DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27:994-997.

Salfinger M, Kafader FM. Comparison of two pretreatment methods for the detection of mycobacteria of BACTEC and Löwenstein-Jensen slants. *J. Microbiol. Meth.* 1987; 6:315-321.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual (2 ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

Sánchez I, Rem  n S. Tipos de micobacterias atípicas aisladas de heces fecales de bovinos reactores positivos

a la tuberculina en unidades no afectadas de tuberculosis. Rvta. Cub. Cienc. Vet. 1980; 11:223-226.

Sankalé M. Tuberculose et urbanisation. Bull. Société de Pathologie Exotique 1983; 76:223-230.

Sapolsky RM, Else JG. Bovine tuberculosis in a wild baboon population: epidemiological aspects. J. Med. Primatol. 1987; 16:229-235.

Savage WG. Mitchell lecture on human tuberculosis of bovine origin. Brit. Med. J. 1933; ii:905-910.

Savic B, Sjöbring U, Alugupalli S, Larsson L, Miörnör H. Evaluation of polymerase chain reaction, tuberculostearic acid analysis, and direct microscopy for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum. J. Infect. Dis. 1992; 66:1177-1180.

Sawa TR, Thoen CO, Nagao WT. *Mycobacterium bovis* infection in wild axis deer in Hawaii. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 1974; 165:998-999.

Saxegaard F, Baess I, Jantzen E. Characterization of clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA-DNA hybridization and cellular fatty acid analysis. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 1988; 96:497-502.

Sánchez I, Remón S. Eficacia comparativa entre diferentes métodos diagnósticos de la tuberculosis bovina. Rev. Cub. Cienc. Vet. 1981; 12:245-248.

Schaefer WB. Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination. Amer. Rev. Resp. Dis. 1965; 92(suppl):85-93.

Schaefer WB, Beer JV, Wood NA, Boughton E, Jenkins PA, Marks J. A bacteriological study of endemic tuberculosis in birds. J. Hyg. 1973; 71:549-558.

Schaefer WB. Serological identification of atypical mycobacteria. Meth. Microbiol. 1980; 13:323-344.

Schiefer B, Gee BR, Ward GE. A disease resembling feline leprosy in Western Canada. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 1974; 165:1085-1087.

Schierwater B, Ender A. Different thermostable DNA Polymerases may amplify different RAPD products. Nucl. Acids Res. 1993; 21:4647-4648.

Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. J. Immunol. 1990; 144:2771-2780.

Schlesinger LS. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. J. Immunol. 1993; 150:2920-2930.

Schlesinger L, Hull SR, Kaufman TM. Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *M. tuberculosis* to human macrophages. J. Immunol. 1994; 152:4070-4079.

Schliesser T. *Mycobacterium bovis* infection in man. En Proceedings of the International Conference on Animal Tuberculosis in Africa and the Middle East, Cairo. The General Organization for Veterinary Services. Moussa AAM, Lotfi O, Mahir S (Eds.). 1992; 193-194.

Schmiedel A. Development and present state of bovine tuberculosis in man. Bull. I.U.A.T. 1968; 40:5-32.

Schmiedel A. Rapid decline in human tuberculosis and persistence of wide-spread tuberculosis in cattle. An unusual epidemiologic situation and its consequences. Bull. I.U.A.T. 1968; 41:297-300.

Schurr E, Malo D, Radzioch D. Genetic control of innate resistance to mycobacterial infections. Key Molecules 1991:42-45.

Schwarz EM, Salgame P, Bloom BR. Molecular regulation of human interleukin 2 and T-cell function by interleukin 4. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90:7734-7738.

Sbarbaro JA. Tuberculosis: the new challenge to the practising clinician. Chest. 1975; 68 (supl.):436-443.

Scott P. IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. Science 1993; 260:1675-1684.

Seder RA, Paul WE, Davis MM, Facekask B. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cell receptor transgenic mice. J. Exp. Med. 1992; 176:1091-1098.

Seibert FB, Munday B. The chemical composition of the active principle of tuberculin: XV. A precipitated purified tuberculin protein suitable for the preparation of a standard tuberculin. Amer. Rev. Tuberc. 1932; 25:724.

Seibert FB. The isolation and properties of the purified protein derivative of tuberculin. Amer. Rev. Tuberc. Pulm. Dis. 1934; 30:713-720.

Senado. Informe de la ponencia designada en el seno de la Comisión de Agricultura y Pesca sobre Sanidad Animal. Boletín Oficial de las Cortes Generales 1992.

Séculi FJ, Séculi J. Patología y Clínica del Perro y del Gato. Productos Neosan 1976:458-463.

Shackelford CC, Reed WM. Disseminated *Mycobacterium avium* infection in a dog. J. Vet. Diagnosis Investig. 1989; 1:273-275.

Shah NM, Dholakavia PM, Heranjal DD, Prajapati KS, Gangopadhyaya RM. Incidence of tuberculosis in blackback end white-spotted deer. Ind. J. An. Sci. 1986; 56:1141-1142.

Shane SM, Camus A, Strain MG, Thoen CO, Tully TN. Tuberculosis in Commercial Emus (*Dromainus novaehollandiae*). Avian Dis. 1993; 37:1172-1176.

Shawar RM, El-Zaatari FAK, Nataraj A, Clarridge JE. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by two step polymerase chain reaction and nonisotopic hybridization methods. J. Clin. Microbiol. 1993; 31:61-65.

Shepard CC, McRae DH. *Mycobacterium leprae* in mice: minimal infectious dose, relationship between staining quality and infectivity, and effect of cortisone. J. Bacteriol. 1965; 89:365-372.

Shield MJ. The importance of immunologically effective contrast with environmental mycobacteria. En The Biology of the Mycobacteria, Vol 2. Ratledge C, Stanford J (Eds.). Academic Press, London (UK). 1983:343-415.

Shoemaker SA, Fisher JH, Jones WD, Scoggin CH. Restriction fragment analysis of chromosomal DNA defines different strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Amer. Rev. Resp. Dis. 1986; 134:210-213.

Shukla RR, Singh G. Studies on tuberculosis amongst Indian buffaloes. Indian Vet. J. 1972; 49:119-123.

Sibley LD, Hunter SW, Brennan PJ, Krahenbuhl JL. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. Infect. Immun. 1988; 56:1232-1236.

Siddiqi SM, Hawangho CC. A new antimicrobial mixture (PANTA) for effective suppression of non-mycobacterial contamination during primary isolation of mycobacteria. Abstrac Amer. Soc. Microb. 1986.

Sigurdsson J. Studies on the risk of infection with bovine tuberculosis to the rural population, with special reference to pulmonary tuberculosis. Acta Tuberc. Scand. Suppl. 1945; 15:1-250.

Silva C, Ekizlerian S, Fazioli R. Role of cord factor in the modulation of infection caused by mycobacteria. Am. J. Pathol. 1985; 118:238-247.

Silva C, Faccioli L. Tumor necrosis factor (cachectin) mediates induction of cachexia by cord factor from

mycobacteria. Infect. Immun 1988; 56:3067-3071.

Sinclair K, Challans JA, Kazwala RR, Hewinson RG, Sharp JM. A multiplex polymerase chain reaction for distinguishing *Mycobacterium tuberculosis* from *Mycobacterium tuberculosis* complex. Mol. Cell. Probes 1995; 9:291-295.

Sjogren I, Hillerdal O. Bovine tuberculosis in man - reinfection or endogenous exacerbation. Scand. J. Resp. Dis. 1978; 59:167-170.

Skuce RA, Brittain D, Hughes MS, Beck L-A, Neill SD. Genomic fingerprinting of *Mycobacterium bovis* from cattle by restriction fragment length analysis. J. Clin. Microbiol. 1994; 32:2387-2392.

Small PM. N. Engl. J. Med. 1991; 324:289.

Small PM, van Embden DA. Molecular epidemiology of tuberculosis. En Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control. Blomm BR (Ed.). American Society for Microbiology. Washington DC (USA) 1994:569-582.

Smida J, Kazda J, Stackebrandt E. Int. J. Lepr. 1988; 56:449-453.

Smith T. A comparative study of bovine tubercle bacilli in man in relation to infection in animals. J. Exp. Med. 1898; 3:451-11.

Smith T. 5 Studies on mammalian tubercle bacilli. III. Description of a bovine bacillus from the human body. A culture test for distinguishing the human from the bovine type of bacilli. J. Med. Res. 1904; 13:253-300.

Smith N. The 'Dassie' bacillus. Tubercle, London 1960; 41:203-212.

Smith BL. Tuberculosis in the opossum. N. Z. Vet. J. 1972; 20:1099.

Smithwick RW. Laboratory manual for acid-fast microscopy, (2 ed). Center for Disease Control, Atlanta (USA) 1976.

Snider WR. Tuberculosis in canine and feline populations. Review of the literature. Amer. Rev. Resp. Dis. 1971; 104:877-887.

Snider WR, Cohen D. The role of dogs and cats in the epidemiology of bovine tuberculosis. First International Seminar on Bovine Tuberculosis for the Americas. Pan American Health Organisation Scientific Publication. 1970; 270:91-100.

Snider WR, Cohen D, Stein SC, Reif JS, Prier JE. Tuberculin sensitivity in a high risk canine population. Amer. J. Epidemiol. 1975; 102:185-190.

Snider DE, Hopewell PC, Mills J, Reichman LB. Mycobacterioses and the acquired immunodeficiency syndrome. Amer. Rev. Resp. Dis. 1987; 136:492-496.

Snyder SB, Richard MJ. Treatment of avian tuberculosis in a whooping crane (*Grus americana*). Proc. Amer. Assoc. Zoo Vet. 1994:167-170.

Soini H, Skurnik M, Liipo K, Tala E, Viljanen MK. Detection and identification of mycobacteria by amplification of a segment of the gene coding for the 32-Kilodalton protein. J. Clin. Microbiol. 1992; 30:2025-2028.

Soliman KN, Rollinson DHL, Barron NS, Spratling FR. An outbreak of naturally acquired tuberculosis in goats. Vet. Rec. 1953; 65:421-425.

Spargo BJ, Crowe LM, Ionedo T, Beaman BL, Crowe JH. Cord-factor (alpha-alpha'-trehalose 6,6' dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88:737-740.

Springett VH, Sutherland I. A re-examination of the variations in the efficacy of BCG vaccination against tuberculosis in clinical trials. *Tubercle Lung Diseases* 1994; 75:227-233.

Sritharin V, Barker R. A simple method for diagnosing *M. tuberculosis* infection in clinical samples using PCR. *Moll. Cell. Probes* 1991; 5:385-395.

Stableforth AW. A bacteriological investigation of cases of tuberculosis in equines. *J. Comp. Pathol.* 1929; 42:91-108.

Stackebrandt E, Smida J. The phylogeny of the genus *Mycobacterium* as determined by 16S rRNA sequences, and development of DNA probes. In *Biology of actinomycetes '88*. Okami Y, Beppu T, Ogawara H (Eds.). Japan Scientific Societies Press, Tokyo (Japan). 1988:244-250.

Stager CE, Libonati JP, Siddiqi SH. Role of solid media when used in conjunction with the BACTEC system for mycobacterial isolation and identification. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29:154-157.

Stahelin H, Karnovsky ML, Suter E. Studies on the interaction between phagocytes and tubercle bacilli. II. The action of phagocytes upon 14C-labeled tubercle bacilli. *J. Exp. Med.* 1956; 104:137-150.

Stahl DA, Urbance JW. The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J. Bacteriol.* 1990; 172:116-124.

Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992; 258:1898-1902.

Stamp JT. Bovine pulmonary tuberculosis. *J. Compar. Pathol.* 1948; 58:9-23.

Standford JL, Grange JM. The meaning and structure of species as applied to mycobacteria. *Tubercle* 1974; 55:143-152.

Stead WW. The unitary concept of tuberculosis in man. *Bull. U.I.A.T.* 1974; 49:318-320.

Steadham JE. Reliable urease test for identification of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 1979; 10:134-137.

Steingrube VA, Gibson JL, Brown BA, Zhang Y, Wilson RW, Rajagopalan M, Wallace RJ. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:149-153.

Stevens J. Tuberculosis in a zoological park. Committee on tuberculosis in animals, Annual Meeting IUATLD, Mainz (Germany) 1994.

Stewart LJ, White SD, Kennedy FA, Pavletic MM. Cutaneous *Mycobacterium avium* infection in a cat. *Vet. Dermatol.* 1994; 4(2):87-90.

Stonebrink B. The use of a pyruvate containing egg medium in the culture of isoniazid resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*. *Acta Tuberc. Scand.* 1958; 35:67-80.

Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature (London)* 1991; 351:456-460.

Street NE, Mosmann TR. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J.* 1991; 5:171-175.

Strominger JL. The gamma delta T cell receptor and class Ib MHC-related proteins: enigmatic molecules of immune recognition. *Cell* 1989; 57:895-898.

Stuart P. Vaccination against Johne's disease in cattle exposed to experimental infection. *Brit. Vet. J.* 1965; 121:289.

- Stuart FA, Manser PA, McIntosh FG. Tuberculosis in imported deer (*Cervus elaphus*). Vet. Rec. 1988; 122:508-511.
- Studdert VP, Hughes KL. Treatment of opportunistic mycobacterial infections with enrofloxacin in cats. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 1992; 201:1388-1390.
- Stuehr DJ, Marletta MA. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or gamma-interferon. J. Immunol. 1987; 139:518-525.
- Stumpff CD. Epidemiological study of a outbreak of bovine tuberculosis in confined elk herds. Proc. US Animal Health Association 1982; 86:528-537.
- Styblo K. Recent advances in epidemiological research in tuberculosis. Advances in Tuberc. Res. 1980; 20:1-63.
- Styblo K, Rouillon A. Estimated global incidence of smear-positive pulmonary tuberculosis. Unreliability of officially reported figures on tuberculosis. Bull. I.U.A.T. 1981; 42:5-104.
- Styblo K. Epidemiology of Tuberculosis. Royal Netherlands Tuberculosis Association Selected Papers 1991;24.
- Suter MM, von Rotz A, Weiss R, Mettler C. Atypical mycobacterial skin granuloma in a cat in Switzerland. Zentralblattv für Veterinarmedizin 1984; 31:712-718.
- Suther BE, Franti CE, Page HH. Evaluation of a comparative intradermal tuberculin test in California dairy cattle. Amer. J. Vet. Res. 1974; 35:633-637.
- Sutherland I, Svandová E. Endogenous reactivation and exogenous reinfection. Their relative importance in the development of non-primary tuberculosis. Bull. U.I.A.T. 1972; 47:123-134.0
- Suzuki Y, Nagata A, Ono Y, Yamada T. Complete nucleotide sequence of the 16S rRNA gene of *Mycobacterium bovis* BCG. J. Bacteriol. 1988; 170:2886-2889.
- Tabet SR, Goldbaum GM, Hooten TM, Eisenach KD, Cace MD, Nolan CM. Restriction fragment length polymorphism analysis detecting a community-based tuberculosis outbreak among persons infected with Human Immunodeficiency Virus. J. Infect. Dis. 1994; 169:189-192.
- Tacquet A, Tison F. Nouvelle technique d'isolement des mycobactéries par le lauryl-sulfate de sodium. Ann. Inst. Pasteur 1961; 100:676-680.
- Tacquet A, Tison F, Polspoel B. L'utilisation des détergents pour l'isolement des mycobacteries a partir de produits pathologiques. Ann. Inst. Pasteur 1965; 16:21-30.
- Takahashi H, Foster V. Detection and Recovery of Mycobacteria by a radiometric procedure. J. Clin. Microbiol. 1983; 17:380-381.
- Tammemagi L, Simmons GC, Kelman R, Hall WTK. A study of tuberculosis-like lesions in cattle slaughtered in Queensland meatworks. Austr. Vet. J. 1973; 49:507-511.
- Tarara R, Suleman MA, Sapolsky R, Wabomba MJ, Else JG. Tuberculosis in wild olive baboons, *Papio cynocephalus anubis* (lesson), in Kenya. J. Wildlife Dis. 1985; 21:137-140.
- Tessaro SV. The existing and potential importance of brucellosis in Canadian wildlife: A review. Can. Vet. J. 1986; 27:119-124.
- Tessaro SV, Forbes LB, Turcotte C. A survey of brucellosis and tuberculosis in bison in and around Wood Buffalo National Park. Can. Vet. J. 1990; 31:174-180.
- Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B, Guesdon JL. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Nucl. Acids Res. 1990; 18:188.

Thierry D, Brisson-Noël A, Vincent-Levy-Frébault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. J. Clin. Microbiol. 1990; 28:2668-2673.

Thilsted JP, Shifrine M. Delayed cutaneous hypersensitivity in the dog: reaction to tuberculin purified protein derivative and coccidioidin. Amer. J. Vet. Res. 1978; 39:1702-1705.

Thoen CO, Farnagin JL, Richards WD. Isolation and identification of mycobacteria from porcine tissues. Amer. J. Vet. Res. 1975; 36:1383-1386.

Thoen CO, Beluhan FZ, Himes EM, Capek V., Bennett BT. *Mycobacterium bovis* infection in baboons (*Papio papio*). Archives of Pathol. Lab. Med. 1977; 101:291-293.

Thoen CO, Jarnagin JL, Muscoplat CC, Cram LS, Johnson DW, Harrington R. Potential uses of lymphoblastogenic responses in diagnosis of bovine tuberculosis. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 1980; 3:355-361.

Thoen CO, Karlson AG, Himes EM. Mycobacterial infections in animals. Rev. Infect. Dis. 1981; 3:960-972.

Thoen CA, Hall MR, Tannis A, Petersburg BS, Harrington R. Detection of micobacterial antibodies in sera of cattle experimentally exposed to *Mycobacterium bovis* by use of modified enzyme linked immunosorbent assay. Proc. 26th Annu. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnosticians 1983:25-38.

Thoen CO, Karlson AG, Himes EM. *Mycobacterium tuberculosis* complex. En The Mycobacteria: A Sourcebook. Wayne LG, Kubica GP (Eds.). New York & Basel: Marcel Dekker Inc, 1984:1209-1229.

Thoen CO, Karlson AG, Himes EM. Disease in domestic and feral animals: *Mycobacterium tuberculosis* complex. En The Mycobacteria: A Sourcebook. Wayne LG, Kubica GP (Eds.). New York & Basel: Marcel Dekker Inc., 1984: 1209-1236.

Thoen CO, Himes EM, Karlson AG. *Mycobacterium avium* complex. En The Mycobacteria: A Sourcebook. Wayne LG, Kubica GP (Eds.). New York & Basel: Marcel Dekker Inc. 1984:1251-1275.

Thoen CO, Himes EM. *Mycobacterium*. En Pathogenesis of bacterial infections in animals. Thoen CO (Ed.). Ames: Iowa State University Press, 1986:26-37.

Thoen CO, Himes EM. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection. En Progress in Veterinary Microbiology and Immunology. Pandey R (Ed.). Basel: Karger, 1986:198-214.

Thoen CO. Tuberculosis in wild and domestic mammals. En Tuberculosis: Pathogenesis, protection, and control. Bloom BR (Ed.). American Society for Microbiology, Washington, DC. 1994.

Thorel MF, Boisvert H. Abcès du chat à *Mycobacterium chelonet*. Bull. Acad. Vét. 1974; 47:415-422.

Thorel MF. Isolation of *Mycobacterium africanum* from monkeys. Tubercle 1980; 61:101-104.

Thorel MF. Techniques d'isolement des mycobactéries. Bull. Inf. Lab. Services Vét. 1982; 7:17-24.

Thorel MF, Haagsma J. Components of media used for isolation of certain slow growing mycobacteria. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 1987; 138:745-749.

Thorel MF, Krichevsky M, Vincent Levy-Frèbault V. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 1990; 40:254-260.

Thorel MF. *Mycobacterium bovis* infection in zoo animals. Committee on tuberculosis in animals, Annual Meeting IUATLD, Mainz (Alemania) 1994.

- Thorns CJ, Morris JA. The immune spectrum of *Mycobacterium bovis* infections in some mammalian species: a review. Vet. Bull., Weybridge 1983; 53:543-550.
- Timmerman KP, Tu CPD. Complete sequence of IS3. Nucleic Acids Res. 1985; 13:2127-2139.
- Timonei JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE. Hagan and Bruner's Microbiology and Infections Diseases of Domestic Animals (8 ed). Comstock Publishing Associates (Cornell Univ. Press) 1988:270-289.
- Tomasovic AA, Rac R, Purcell DA. *Mycobacterium xenopy* in a skin lesion of a cat. Austr. Vet. J. 1976; 52:103.
- Toosi Z, Young T, Gogate P, Ellner JJ. Expression of transforming growth factor-beta in lung granulomas and peripheral blood monocytes of patients with tuberculosis. abstr. 26th Joint Conf. Tuberc. Lepr. 1991:57-62.
- Torning K. Bovine tuberculosis. Dis. Chest 1965; 47:241-246.
- Tortoli E, Simoneti MT, Dionisio D, Meli M. Cultural studies on two isolates of *Mycobacterium genavense* from patients with acquired immunodeficiency syndrome. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1994; 18:7-12.
- Towar DR, Scott RM, Goyings LS. Tuberculosis in a captive deer herd. Amer. J. Vet. Res. 1965; 26:339-346.
- Tsicopoulos A, Hamid Q, Varney V, et al. Preferential messenger RNA expression of Th1-type cells (IFN-gamma+, IL-2+) in classical delayed-type (tuberculin) hypersensitivity reactions in human skin. J. Immunol. 1992; 148:2058-2061.
- Tsukamura M. Differentiation of mycobacteria by picric acid tolerance. Amer. Rev. Resp. Dis. 1965; 92:491-492.
- Tsukamura M. Identification of mycobacteria. Tubercle, London 1967; 48:311-338.
- Tsukamura M. Numerical classification of slowly growing mycobacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 1976; 26:409-420.
- Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor beta. Nature 1988; 334:260-262.
- Tweddle NE, Livingstone P. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. Vet. Microbiol. 1994; 40:23-39.
- Vaillaud JC, Viallier J, Ollagnier C, Sarrouy C. Un exemple de contamination interhumaine de la tuberculose pulmonaire a bacille bovin. Poumon Coeur 1966; 22:1167-1168.
- Valone SE, Rich EA, Wallis RS, Ellner JJ. Expression of tumor necrosis factor in vitro by human mononuclear phagocytes stimulated with whole *Mycobacterium bovis* BCG and mycobacterial antigens. Infect. Immun. 1988; 56:3313-3315.
- van Embden JDA, van Sooligen D, Small PM, Hermans PWD. Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis. Res. Microbiol. 1992; 143:385-391.
- van Embden JDA, Cave D, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J. Clin. Microbiol. 1993; 31:406-409.
- van Soolingen D, Hermans PWM, de Haas PEW, Soll DR, van Embden JDA. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 1991; 29:2578-2586.
- van Soolingen D, Hermans PWM, de Haas PEW, van Embden JDA. Insertion element IS1081-associated restriction fragment polyorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. J. Clin. Microbiol. 1992; 30:1772-1777.

- van Soolingen D, de Haas PEW, Hermans PWM, Groenen PMA, van Embden JDA. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 1993; 31:1987-1995.
- van Soolingen D, de Haas PEW, Haagsma J, Eger T, Hermans PWM, ritacco V, Alito A, Embden JDA. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. J. Clin. Microbiol 1994; 32:2425-2433.
- van Soolingen D, Qian L, de Haas PEW, Douglas JT, Traore H, Portaels F, Zi Qing H, Enkhsaikan D, Nymadawa P, van Embden JDA. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. J. Clin. Microbiol. 1995; 33:3234-3238.
- Van-Eys GJJM, Gravekamp C, Gerritsen MJ. Detection of leptospire in urine by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1989; 27:2258-2262.
- VanDerHeyden N. Update on Avian Mycobacteriosis. Proc. Assoc. Avian Vet. 1994:53-61.
- Vardaman TH, Larsen AB. The complement-fixation test for detecting tuberculosis in cattle. Amer. J. Vet. Res. 1964; 25:690-692.
- Veerman GM, Kelman R, Colley J, Pike JG. Rapid confirmatory identification of *Mycobacterium bovis* using a dot blotting immunodetection technique. Vet. Microbiol. 1990; 22:335-340.
- Vera A, Volkovsky G. Importancia de las heces como fuente secundaria de infección en la tuberculosis bovina. Revta. Cub. Cienc. Vet. 1980; 11:227-233.
- Vera A, Volkovsky G. Supervivencia de *Mycobacterium bovis* en heces fecales bovinas durante las diferentes épocas del año en Cuba. Revta. Cub. Cienc. Vet. 1982; 13:65-74.
- Veringa E, van Harsselaar B, Hermans P. Polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium tuberculosis* in a clinical microbiology laboratory. J. Microbiol. Meth. 1992; 16:139-147.
- Vestal AL, Kubica GP. Differential identification of mycobacteria. III. Use of thiacetazone, thiophen-2-carboxylic acid hydrazine and triphenyltetrazolium chloride. Scand. J. Respir. Dis. 1967; 48:142-148.
- Vestal AL. Procedures for the isolation and identification of mycobacteria. Atlanta: US Department of Health, Education and Welfare, Centers for Disease Control, PHS No.15, 1975.
- Vidal D, Domingo M, Aranaz A, Liébana E, Prats N, Marco A, Casal J, Domínguez L, Mateos A. Eradication of tuberculosis from goat herds by means of the interferon-gamma assay and the single intradermal comparative skin test. Proceedings of the Second International Conference on *Mycobacterium bovis*, 1995. Otago Conferences Series, University of Otago (Ed.) 3:328-330.
- Virtanen S. A study of nitrate reduction by mycobacteria. Acta Tuber. Scand. Suppl. 1960; 48:1-119.
- Waddington FG, Elwood DC. An experiment to challenge the resistance to tuberculosis in BCG vaccinated cattle in Malawi. Brit. Vet. J. 1972; 128:541-551.
- Wagner JC, Buchanan G, Bokkenheuser V, Levisseur S. An acid-fast bacillus isolated from the lungs of a cape hyrax, *Procavia capensis* (Pallus). Nature 1958; 181:284-285.
- Wagner JC, Bokkenheuser V. The Mycobacterium isolated from the dassie *Procavia Capensis* (Pallus). Tubercle (London) 1961; 42:47-56.
- Wagner B. Risk assessment for *Mycobacterium bovis* in cervidae. Animal Health Insight 1993 (summer):22-32.
- Wakelin CA, Churchman OT. Prevalence of bovine tuberculosis in feral pigs in Central Otago. Surveillance 1991; 18:19-20.

Wallace R, Carriere J, Diena BB, Greenberg L. The bentonite flocculation test in the serology of tuberculosis II. Detection of tuberculosis in cattle. *Can. J. Microbiol.* 1968; 14:887-890.

Wallis RS, Amir-Tahmasseb M, Ellner JJ. Induction of interleukin 1 and tumor necrosis factor by mycobacterial proteins: The monocyte Western blot. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87:3348-3352.

Wallis RS, Paranjape R, Phillips M. Identification by two-dimensional gel electrophoresis of a 58-kilodalton tumor necrosis factor-induced protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 1993; 61:627-632.

Wards BJ, Collins DM, de Lisle GW. Detection of *Micobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 1995; 43:227-240.

Watson EA. Tuberculin, Johnin and mallein derived from non proteinmedia. *Can. J. Publ. Hlth.* 1935; 26:268-275.

Wayne LG, Doubek JR, Russell RL. Classification and identification of mycobacteria. I. Tests employing Tween 80 as substrate. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1964; 90:588-597.

Wayne LG, Gross WN. Base composition of deoxyribonucleic acid isolated from mycobacteria. *J. Bacteriol.* 1968; 96:1915.

Wayne LG. Simple pyrazinamidase and urease test for routine identification of mycobacteria. *Amer. Rev. Respir. Dis.* 1974; 109:147-151.

Wayne LG, Engbaek HC, Engel HWB, Froman S, Gross W, Hawkins J, K  ppler W, Karlson AG, Kleeberg HH, Krasnow I, Kubica GP, McDurmont C, Nel EE, Pattyn SR, Schröder KH, Tarnok I, Tsukamura M, Vergmann B, wolinsky E. Highly reproducible techniques for use in systematic bacteriology in the genus *Mycobacterium*: tests for pigment, urease, resistance to sodium chloride, hydrolysis of Tween 80, and Beta-galactosidase. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1974; 24:412-419.

Wayne LG, Dietz TM, Gernez-Rieux C, Jenkins PA, K  ppler W, Kubica GP, Kwapinski JBG, Meissner G, Pattyn SR, Runyon EH, Schröder KH, Silcox VA, Tacquet A, Tsukamura M, Wolinsky E. A cooperative numerical analysis of scotochromogenic slowly growing mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 1974; 66:255-271.

Wayne LG, Engel HWB, Grassi C, Gross W, Hawkins J, Jenkins PA, K  ppler W, Kleeberg HH, Krasnow I, Nel EE, Pattyn SR, Richards PA, Showalter S, Slosarek M, Szabo I, Tarnok I, Tsukamura M, Vergmann B, Wolinsky E. Highly reproducible techniques for use in systematic bacteriology in the genus *Mycobacterium*: tests for niacin and catalase and for resistance to isozianid, thiophene-2-carboxylic acid hydrazine, hydroxylamine, and p-nitrobenzoate. *International J. Syst. Bacteriol.* 1976; 26:311-318.

Wayne LG, Andrade L, Froman S, K  ppler W, Kubala E, Meissner G, Tsukamura M. A co-operative numerical analysis of *Mycobacterium gastri*, *Mycobacterium Kansasii* and *Mycobacterium marinun*. *J. Gen. Microbiol* 1978; 109:319-327.

Wayne LG, Krichevsky EJ, Love LL, Johnson R, Krichevsky MI. Taxonomic probability matrix for use with slowly growing mycobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1980; 30:528-538.

Wayne LG, Good RC, Krichevsky MI, Beam RE, Blacklock Z, Chaparas D, Dawson D, Froman S, Gross W, Hawkins J, Jenkins PA, Juhlin I, K  ppler W, Kleeberg HH, Krasnow I, Lefford MJ, Mankiewick E, McDurmont C, Meissner G, Morgan P, Nel EE, Pattyn SR, Portaels F, Richards PA, R  sch S, Schröder KH, Silcox VA, Szabo I, Tsukamura M, Vergmann B. First Report of the cooperative, open-ended study of slowly growing mycobacteria by the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1981; 31:1-20.

Wayne LG. Microbiology of tubercle bacilli. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1982; 12:31-41.

Wayne LG, Good RC, Krichevsky MI, Beam RE, Blacklock Z, David HL, Dawson D, Gross W, Hawkins J, Jenkins PA, Juhlin I, K  ppler W, Kleeberg HH, Krasnow I, Lefford MJ, Mankiewick E, McDurmont C, Nel EE,

Portaels F, Richards PA, Rüsch S, Schröder KH, Silcox VA, Szabo I, Tsukamura M, Vanden Breen L, Vergmann B. Second report of the cooperative, open-ended study of slowly growing mycobacteria by the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1983; 33:265-274.

Wayne GL. Mycobacterial speciation. En *The Mycobacteria, A sourcebook*. Wayne LG, Kubica GP (Eds.). New York and Basel: Marcel Dekker Inc, 1984:42-43.

Wayne LG, Krichevsky MI, Portyrata D, Jackson CK. Diagnostic probability matrix for identification of slowly growing mycobacteria in clinical laboratories. *Journal of Clinical Microbiology* 1984; 20:722-729.

Wayne LG, Kubica GP. The Mycobacteria. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Sneath PHA, Sharpe ME, Holt GJ (Eds.). Baltimore: Williams and Wilkins, 1986:1435-1457.

Wayne LG, Diaz GA. Intrinsic catalase dot blot immunoassay for identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, and *Mycobacterium intracellulare*. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25:1687-1690.

Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP, Trüper HG. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1987; 37:463-464.

Wayne LG, Good RC, Krichevsky MI, Blacklock Z, David HL, Dawson D, Gross W, Hawkins J, Jenkins PA, Juhlin I, Kämpfer W, Kleeberg HH, Levy-Frébault V, McDermont C, Nel EE, Portaels F, Rüsch-Gerdes S, Schröder KH, Silcox VA, Szabo I, Tsukamura M, Van den Breen L, Vergmann B, Yakus MA. Third report of the cooperative, open-ended study of slowly growing mycobacteria by the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1989; 39:267-278.

Wayne LG, Good RC, Krichevsky MI, Blacklock Z, David HL, Dawson D, Gross W, Hawkins J, Levy-Frébault V, McManus C, Portaels F, Rüsch-Gerdes S, Schröder KH, Silcox VA, Szabo I, Tsukamura M, Van den Breen L, Yakus MA. Fourth report of the cooperative, open-ended study of slowly growing Mycobacteria by the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1991; 41:463-472.

Wayne LG, Sramek HA. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 1992; 5:1-25.

Wells AQ, Oxen DM. Tuberculosis in wild voles. *The Lancet* 1937; 1:1221.

Wells WF, Lurie MB. Experimental air-borne disease. Quantitative natural respiratory contagion of tuberculosis. *Amer. J. Hyg.* 1941; 34:21-42.

Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 1990; 18:7213-7218.

White SD, Ihrke PJ, Stannard AA. Cutaneous atypical mycobacteriosis in cats. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 1983; 182:1218-1222.

White SD. Cutaneous Mycobacteriosis. *Kirk* 1986;IX:529-531.

White PD, Kowalski JJ. Enrofloxacin-responsive cutaneous atypical mycobacterial infection in two cats. *Proc. American Academy Veterinary Dermatology/American College Veterinary Dermatology* 1991:95.

Whitehead JEM, Wildy R, Engbaek HC. Arylsulfatase activity of mycobacteria. *J. Pathol. Bacteriol.* 1953; 65:451-460.

WHO. Report of the WHO meeting on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) with the participation of FAO. 1993.

WHO. Report of a WHO/FAO/OIE consultation on animal tuberculosis vaccines. 1994.

WHO. WHO report on the tuberculosis epidemic. General distribution document (WHO/TB/95.183). Geneva:

WHO 1995.

Wiegshauss E, Balasubramanian V, Smith DW. Immunity to tuberculosis from perspective of pathogenesis. *Infect. Immun.* 1989; 57:3671-3676.

Wieselthaler M. Susceptibility of a dog to *Mycobacterium tuberculosis* - a field study. *Wien Tierarztl Monatsschr* 1975; 62:357-361.

Wigle WD, Ashley MJ, Killough EM, Cosens M. Bovine tuberculosis in humans in Ontario. The epidemiologic features of 31 active cases occurring between 1964 and 1970. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1972; 106:528-534.

Wiker HG, Harboe M, Nagai S, Patarroyo ME, Ramirez C, Cruz N. MPB59, a widely cross-reacting protein of *Mycobacterium bovis* BCG. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 1986; 81:307-314.

Wiker HG, Harboe M, Lea TE. Purification and characterization of two protein antigens from the heterogeneous BCG85 complex in *Mycobacterium bovis* BCG. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1986; 81:298-306.

Wilesmith JW, Little TWA, Thompson HV, Swan C. Bovine tuberculosis in domestic and wild animals in an area of Dorset:1. Tuberculosis in cattle. *J. Hyg.* 1982; 89:195-210.

Wilesmith JW. Epidemiological features of bovine tuberculosis in cattle herds in Great Britain. *J. Hyg.* 1983; 90:159-176.

Wilesmith JW, Sayers PE, Bode R, et al. Tuberculosis in East Sussex: II. Aspects of badger ecology and surveillance for tuberculosis in badger populations (1976-1984). *J. Hyg.* 1986; 97:11-26.

Wilkins EGL, Griffiths RJ, Roberts C. Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*. *Thorax* 1986; 41:685-687.

Wilkins EGL, Griffiths RJ, Roberts C, Green HT. Tuberculosis meningitis due to *Mycobacterium bovis*. A report of two cases. *Postgraduate Medical Journal* 1986; 63:653-655.

Wilkinson GT, Kelly WR, O'Boyle D. Cutaneous granulomas associated with *Mycobacterium fortuitum* infection in a cat. *J. Small Animal Pract.* 1978; 19:357-362.

Wilkinson GT, Kelly WR, O'Boyle D. Pyogranulomatous panniculitis in cats due to *Mycobacterium smegmatis*. *Austr. Vet. J.* 1982; 58:77-78.

Willemse T, Groothuis DG, Koeman JP, Beyer EG. *Mycobacterium thermoresistibile*: extrapulmonary infection in a cat. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 21:854-856.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 1990; 18:6531-6535.

Wilson P, Herrington R. A case of bovine tuberculosis in a fallow deer. *Vet. Rec.* 1976; 98:74.

Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. En *Current Protocols in Molecular Biology* (1 ed). Ausubel FM, Kingston RE, Moore DD, Seidman GJ, Smith JA, Struhl K (Eds.). New York: John Wiley & Sons Inc, 1988:2-4.

Wilson SC, Veatch J. Investigation of suspected mycobacteriosis in a group of tropical birds at the Topeka Zoological Park. *Proc. Am. Assoc. Zoo Vet.* 1994:164-166.

Wilson ML, Stone BL, Hildred MV, Reves RR. Comparison of recovery rates for mycobacteria from BACTEC 12B vials, Middlebrook 7H11-selective 7H11 biplates, and Lowenstein-Jensen slants in a Public Health Mycobacteriology Laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:2516-2518.

Wilton S, Cousins D. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification

in a single tube. PCR: Meth. Appl. 1992; 1:269-273.

Woerpel RW, Roskopf WR. Retro-orbital *Mycobacterium tuberculosis* infection in a yellow-napped Amazon parrot (*Amazona ochrocephala auropalliata*). En Proc. of the Annual Meeting of the Association of Avian Veterinarians 1983;71-76.

Woese CR, Gutell R, Gupta R, Noller H. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal nucleic acids. Microbiol. Rev. 1983; 47:621-669.

Woese CR. Bacterial Evolution. Microbiol. Rev. 1987; 51:221-271.

Wolinsky E, Schaefer WB. Proposed numbering scheme for mycobacterial serotypes by agglutination. Int. J. Syst. Bacteriol. 1973; 23:182-183.

Wood PR, Ripper J, Radford AJ, Bundesen PG, Rylatt DB, Cottis LE, John M, Plackett P. Production and characterization of monoclonal antibodies to *Mycobacterium bovis*. J. Gen. Microbiol. 1988; 134:2599-2604.

Wood PR, Rothel JS, McWaters PGD, Jones SL. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for bovine gamma-interferon. Vet. Immunol. Immunopathol. 1990; 25:37-46.

Wood PR, Corner LA, Plackett P. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma-interferon. Res. Vet. Science 1990; 49:46-49.

Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Baldock C, Jones SL, Cousins DB, McCormick BS, Francis BR, Creeper J, Tweddle NE. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. Aust. Vet. J. 1991; 68:286-290.

Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Ripper JI, Fifis T, McCormick BS, Francis B, Melville L, Small K, de Witte K, Tolson J, Ryan TJ, de Lisle GW, Jones SL, Cox JC. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. Vet. Microbiol. 1992; 31:71-79.

Wood PR, Rothel JS. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. Vet. Microbiol. 1994; 40:125-135.

Wood P, Monaghan M, Rothel J. Preface. Veterinary Microbiology 1994; 40:vii.

Woodford MH. Tuberculosis in wildlife in the Ruwenzori National Park, Uganda. Part 11. Trop. Animal Health Prod. 1982; 14:155-160.

Woods GL, Washington JA. Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: Review of Microbiologic and clinical aspects. Rev. of Infect. Dis. 1987; 9:275-294.

Worthington RW. Mycobacterial sensitins and the non-specific reactor problem. Onderstepoort J. Vet. Res. 1967; 34:345-438.

Wray C. Survival and spread of pathogenic bacteria of veterinary importance within the environment. Vet. Bull. 1975; 45:543-550.

Wright PA, Wynford-Thomas D. The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. J. Pathol. 1990; 162:99-117.

Yajko DM, Nassos PS, Sanders CA. Comparison of four decontamination methods for recovery of *M. avium* complex from stools. J. Clin. Microbiol. 1993; 31:302-306.

Yamaguchi R, Matsuo K, Yamazaki A, Nagai S, Terasaka K, Yamada T. Immunogenic protein MPB57 from *Mycobacterium bovis* BCG: molecular cloning, nucleotide sequence and expression. FEBS Lett. 1988; 240:115-117.

- Yamamoto T, Nishiura M, Harada N, Imaeda T. Electron microscopy of ultra-thin sections of lepra cells and *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Lepr.* 1958; 26:1-8.
- Yates MD, Collins CH. Identification of tubercle bacilli. *Ann. Microbiol.* 1979; 130B:13-19.
- Yates MD, Grange JM. Incidence and nature of human tuberculosis due to bovine tubercle bacilli in South-East England: 1977-1987. *Epidemiol. Infect.* 1988; 101:225-229.
- Yeager HJ, Lacy J, Smith LR, LeMaistre CA. Quantitative studies of mycobacterial populations in sputum and saliva. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1967; 95:998-1004.
- Yoshimura HH, Graham DY. Nucleic acid hybridization studies of mycobactin-dependent mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26: 1309-1312.
- Youmans GP. Tuberculosis. Philadelphia: W.B. Saunders 1979.
- Young RA. Stress proteins and immunology. *Ann. Rev. Immunol.* 1990; 8:401-420.
- Young DB, Garbe T, Lathigra R, Abou-Zeid C. Protein antigens: structure function and regulation. In *Molecular Biology of the Mycobacteria*. McFadden JJ (Ed.). Surrey University Press, London 1990:1-35.
- Young DB, Garbe TR. Heat shock proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 1991; 59:3086-3093.
- Yuen LKW, Ross BC, Jackson KM, Dwyer B. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by southern blot hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:1615-1618.
- Yugi H, Nozaki C. Serologic diagnosis of bovine tuberculosis. *Amer. J. Vet. Res.* 1972; 33:1377-1384.
- Zainuddin ZF, Dale JW. Polymorphic repetitive DNA sequences in *Mycobacterium tuberculosis* detected with a gene probe from a *Mycobacterium fortuitum* plasmid. *J. Gen. Microbiol.* 1989; 135:2347-2355.
- Zeiss CJ, Jardine J, Huchzermeyer H. A case of Disseminated Tuberculosis in a Dog Caused by *Mycobacterium avium-intracellulare*. *J. Amer. Animal Hosp. Assoc.* 1994; 30:419-424.
- Zhang Y, Doerfler M, Lee TC. Mechanisms of stimulation of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α by *Mycobacterium tuberculosis* components. *J. Clin. Invest.* 1993; 91:2076-2083.
- Zhang Y, Rom WN. Regulation of the interleukin-1 β (IL-1 β) gene by mycobacterial components and lipo-polysaccharide is mediated by two nuclear factor-IL6 motifs. *Mol. Cell. Biol.* 1993; 13:3831-3837.
- Zimmerman R, Marafino B, Chan A, Landre P, Winkelhake J. The role of oxidant injury in tumor cell sensitivity to recombinant tumor necrosis factor in vivo. *J. Immunol.* 1989; 142:1405-1409.
- Zopf W. Die Spaltpilze. Edward Trewendt 1883.
- Zuckerman L. Badgers, cattle and tuberculosis: Rt. Hon. Peter Walker MP, 1980.
- Zwadyk PJ, Down JA, Myers N, Dey MS. Rendering of mycobacteria safe for molecular diagnostic studies and development of a lysis method for strand displacement amplification and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32:2140-2146.